

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN

Biotechnologie degli Alimenti

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza:
AGR/15

***Studi ed approfondimenti sulla composizione in acidi grassi del
latte bovino di razza Reggiana con diverso fenotipo per κ -caseina
e β -lattoglobulina***

Presentata dalla dott.ssa:

SELENIA MELIA

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof.

GIUSEPPE LOSI

Chiar.mo Prof.

GIAN BATTISTA CASTAGNETTI

Esame finale anno 2009

INDICE

CAPITOLO 1 LA RAZZA REGGIANA.....	4
1.1. LA STORIA DELLA RAZZA REGGIANA.....	4
1.2. I CARATTERI MORFOLOGICI E LE CARATTERISTICHE PRODUTTIVE.....	6
CAPITOLO 2 IL LATTE.....	9
2.1. SECREZIONE E COMPOSIZIONE MACROSCOPICA DEL LATTE.....	9
2.2. I FATTORI CHE INFLUENZANO LA COMPOSIZIONE DEL LATTE.....	15
CAPITOLO 3 LA FRAZIONE PROTEICA.....	20
3.1. LA FRAZIONE PROTEICA DEL LATTE BOVINO.....	20
3.2. IL POLIMORFISMO GENETICO DELLE PROTEINE.....	29
3.3. L'INFLUENZA DEL POLIMORFISMO GENETICO SULLE CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE DEL LATTE.....	35
3.4. L'INFLUENZA DELLE VARIANTI GENETICHE DELLE PROTEINE SULLE CARATTERISTICHE PRODUTTIVE DEL LATTE.....	38
CAPITOLO 4 LA FRAZIONE LIPIDICA.....	41
4.1. LA FRAZIONE LIPIDICA DEL LATTE BOVINO.....	41

4.2. CLASSIFICAZIONE E NOMENCLATURA DEGLI ACIDI GRASSI.....	45
4.3. SINTESI DEGLI ACIDI GRASSI.....	47
4.4. METABOLISMO LIPIDICO RUMINALE.....	48
4.5. IL GLOBULO DI GRASSO.....	53
4.6. LA MEMBRANA DEL GLOBULO DI GRASSO.....	58
4.7. ALTERAZIONI DEL GRASSO.....	61
4.8. VARIABILITÀ DELLA COMPOSIZIONE IN ACIDI GRASSI.....	63
• 4.8.1. L'IMPORTANZA A LIVELLO NUTRIZIONALE DEGLI ACIDI GRASSI.....	66
• 4.8.2. I CLA (CONJUGATED LINOLEIC ACIDS) NEL LATTE.....	69
• 4.8.3. GLI ω -6 E ω -3 NEL LATTE.....	71
CAPITOLO 5 PARTE SPERIMENTALE.....	77
5.1. INTRODUZIONE.....	77
5.2. SCOPO DELLA RICERCA.....	79
5.3. MATERIALI E METODI.....	80
• 5.3.1 Selezione delle bovine Reggiane e raccolta dei campioni di latte dagli allevamenti.....	80
• 5.3.2. Caratterizzazione del polimorfismo genetico proteico del latte bovino.....	82
• 5.3.3. Trattamento dei campioni.....	82

• 5.3.4. Determinazione della composizione macroscopica dei campioni di latte.....	82
• 5.3.5. Determinazione della composizione in acidi grassi dei campioni di latte.....	82
• 5.3.6. Analisi statistica.....	83
• 5.3.7 Selezione delle bovine di razza Reggiana e Frisona e raccolta dei campioni di latte.....	83
• 5.3.8. Determinazione e analisi della dimensione dei globuli di grasso.....	84
 5.4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	85
• 5.4.1. Analisi della composizione macroscopica del latte con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg.....	85
• 5.4.2. Analisi della composizione in acidi grassi del latte con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg.....	90
• 5.4.3. Analisi della composizione in acidi grassi del latte con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg nei due allevamenti selezionati.....	98
• 5.4.4. Analisi della distribuzione della dimensione dei globuli di grasso nel latte di razza Frisona e Reggiana.....	109
 5.5. CONCLUSIONI.....	114
 RINGRAZIAMENTI.....	115
 BIBLIOGRAFIA.....	116

CAPITOLO 1

1.1. LA STORIA DELLA RAZZA REGGIANA

La bovina Reggiana è una razza autoctona dell'Italia settentrionale, presente in particolar modo nelle province di Reggio Emilia e di Parma. Secondo fonti storiche, le origini della razza Reggiana sono molto antiche e risalgono ai bovini giunti nel nostro paese con le invasioni barbariche. Le prime notizie sulla razza bovina Reggiana, conosciuta anche come “vacca rossa” o “Fromentina” fornite dall'agronomo Filippo Re, risalgono all'inizio dell'Ottocento, ma la sua storia si fonde nelle origini con quella del popolo Longobardo che, dilagò verso occidente dopo la disgregazione dell'Impero romano ed entrò in Italia nel 568 (VI secolo), introducendo nella Val Padana bovini depredati nelle pianure della Russia meridionale e dell'antica Pannonia.

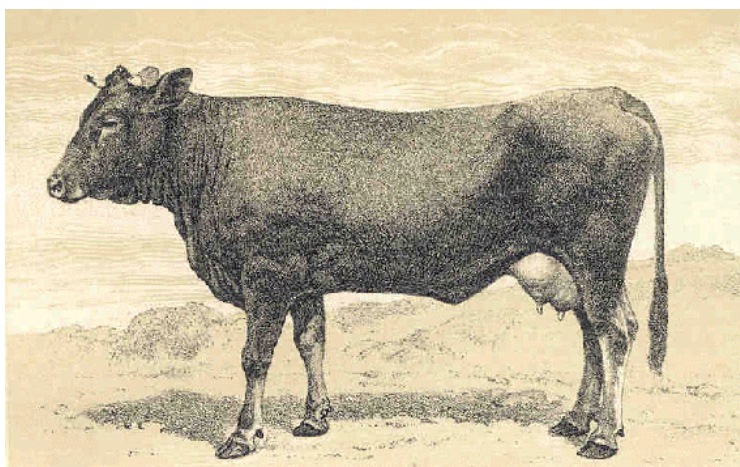


Figura 1. Bovina di razza Reggiana [Da: www.itazanelli.it]

Molti di questi bovini, appartenenti al ceppo podolico, avevano il mantello rosso, una caratteristica dominante trasmessa dalle antiche bovine rosse della steppa russa, tuttora presenti nell'Ucraina e nella Russia centrale [www.agraria.org; www.aiab.it; www.itazanelli.it; www.razzareggiana.it; Salza *et al.*, 2005]. Con i Longobardi inizia, pertanto, una riconversione zootecnica che porta i bovini a sostituire gli ovini, dando

origine ad una “rivoluzione casearia”. Grandi sostenitori di questi nuovi indirizzi furono i monaci Benedettini, i quali con le loro opere di bonifica e la successiva messa a coltivazione dei terreni, crearono le premesse per lo sviluppo di nuove attività agricole quali l'allevamento del bestiame e la produzione del formaggio Grana. Le vacche rosse a triplice attitudine, nei territori in destra Po', trovarono condizioni ambientali particolarmente favorevoli per il loro sviluppo e, fin dai secoli intorno al Mille, sostituirono le razze locali preesistenti, mantenendo una supremazia incontrastata fino alla prima metà del '900. Infatti la razza fu protagonista nel contesto agricolo e zootecnico reggiano e parmense tanto da essere la più allevata fino alla metà del XX secolo, quando raggiunse l'apice nel 1954 con una consistenza di 139.695 capi. Nel 1956 viene costituita l'associazione nazionale Allevatori bovini di razza Reggiana (ANaBoRaRe), riconosciuta ufficialmente nel maggio del 1962. Ma la politica zootecnica italiana del dopoguerra, per perseguire più elevati obiettivi di produzione attraverso la selezione, iniziò incroci di sostituzione di queste bovine con razze cosmopolite, per far fronte ad un maggior sviluppo dell'industria casearia con crescenti richieste di latte da destinare alla trasformazione [www.itazanelli.it].

Proprio in questi anni, infatti, avvengono profondi cambiamenti nell'agricoltura e nella società [Diolaiti, 2008]. Tra le cause della progressiva riduzione dei bovini di razza Reggiana si possono annoverare la scomparsa della mezzadria, le mutate condizioni di allevamento, il ritardo del pagamento del latte su parametri qualitativi, l'introduzione di razze cosmopolite più produttive e la mancanza di un concreto programma di miglioramento genetico. Negli anni '70 la razza Reggiana risultava quasi scomparsa, ma il minimo storico venne raggiunto nel 1981 con 985 capi. Dal 1985 è stato istituito il Registro Anagrafico delle popolazioni bovine autoctone e gruppi etnici a limitata diffusione, per salvaguardare le razze bovine minacciate di estinzione e i loro patrimoni genetici. Pertanto negli ultimi 20 anni grazie agli allevatori, tecnici e strutture pubbliche è stato possibile un parziale recupero e un rinnovato interesse per questa razza, che dal 1987 ha iniziato a far registrare una lenta ripresa numerica. Dopo anni di attività selettiva da parte degli allevatori, questa razza oggi può essere considerata ad attitudine esclusivamente lattifera, infatti in particolare, la qualità del latte e nuove strategie di valorizzazione, sostenute dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali e della Regione Emilia Romagna, ne determinarono da allora un costante recupero demografico, tanto che la

consistenza attuale è di 2.565 capi presenti in 177 allevamenti, con la maggior parte delle aziende presenti in provincia di Reggio Emilia [www.razzareggiana.it]. Ciò è stato possibile, in particolar modo, dopo aver ricostruito un'identità razza-prodotto (produzione di Parmigiano Reggiano delle Vacche Rosse) e la sua tracciabilità, che ha permesso il recupero di una valenza economica che è stata alla base della ripresa dello sviluppo numerico della razza [www.arpa.emr.it].

1.2. I CARATTERI MORFOLOGICI E LE CARATTERISTICHE PRODUTTIVE

Bovino contraddistinto da una notevole rusticità e longevità, la razza Reggiana si caratterizza morfologicamente per il mantello rosso “fromentino” uniforme (dal colore della cariosside di frumento), che può assumere varianti di tonalità nelle parti interne ed inferiori degli arti, nel contorno degli occhi, attorno al musello e nella parte interna della coda. Da questa colorazione deriva la denominazione di “vacca rossa”. La testa è molto distinta, caratterizzata da una fronte spaziosa lievemente concava, profilo fronto-nasale rettilineo, occhi grandi, sguardo tranquillo. Il torace è ben sviluppato, la pelle è di medio spessore e gli arti sono robusti.

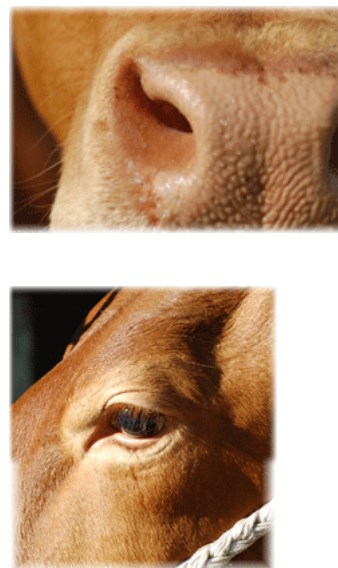


Figura 2.

[Da: www.razzareggiana.it]

La mammella è l'organo che presenta ancora una certa eterogeneità nelle caratteristiche della razza, in quanto generalmente è sviluppata ma non voluminosa. Infatti oggi il trend morfologico-funzionale è in costante miglioramento, con particolare attenzione all'apparato mammario.

I soggetti di questa razza sono di carattere docile ma nevrile, presentano una taglia media, con altezza al garrese che varia, nei capi adulti dai 145/155 cm dei tori (con un peso medio

di 9-10 quintali) ai 140/145 cm delle bovine (con un peso medio di 6,5-7 quintali) [www.itazanelli.it; www.razzareggiana.it; Salza *et al.*, 2005].



Figura 3. Bovina di razza Reggiana [Da: www.razzareggiana.it]

La rusticità della razza le consente, rispetto a razze più selezionate, di sfruttare meglio foraggi grossolani, ridurre le spese sanitarie e la quota di rimonta, infatti in media si raggiungono 4-5 parti a capo, con qualche eccezione rappresentata da alcune bovine che raggiungono anche 10 parti. Buoni i parametri di fertilità e fecondità, con un intervallo medio parto-concepimento di 98 giorni e un numero di interventi fecondativi di 1,7. Utilizzata a suo tempo come razza a triplice attitudine, la razza Reggiana è attualmente impiegata per la sua prevalente attitudine alla produzione lattiera, in quanto il latte ottenuto risulta caratterizzato, come è noto, da elevati parametri qualitativi particolarmente idonei alla trasformazione in formaggio Parmigiano Reggiano.

Le differenze più interessanti e significative tra le razze bovine locali (Reggiana, Bruna Alpina e Bianca Val Padana) e la Frisone Pezzata Nera sono note da più di 25 anni. In particolare alcuni studi [Morini *et al.*, 1975; 1983; Castagnetti *et al.*, 1986; Mariani *et al.*, 1987] hanno dimostrato la superiorità del latte della Reggiana, che presenta contenuti più elevati di sostanza secca, caseina, ceneri, calcio, fosforo e acido citrico; ha un'acidità titolabile superiore, una buona capacità di affioramento e si caratterizza infine per un minor contenuto di cloruri.

Nel latte della Reggiana, inoltre, tra le frequenze fenotipiche delle proteine evidenziate fino ad oggi mediante l'utilizzo delle tecniche elettroforetiche, le più frequenti sono quelle omozigoti per A, per B ed eterozigoti per AB; in particolare la variante B, di β -caseina e di

κ -caseina, è ritenuta maggiormente vantaggiosa per la caseificazione, in quanto è noto che il latte prodotto da bovine con κ -Cn BB, presenta dei parametri lattodinamometrici e reologici nettamente più favorevoli rispetto al latte caratterizzato dal fenotipo κ -Cn AA [Morini *et al.*, 1975; Mariani *et al.*, 1976; Morini *et al.*, 1983; Schaar *et al.*, 1985; Castagnetti *et al.*, 1986]. Nella razza Reggiana gli studi del latte effettuati sulla frequenza genica e genotipica su tutta la popolazione e continuamente aggiornati, evidenziano come la variante B della κ -caseina sia presente con una frequenza del 27%, considerata fra le più elevate tra le razze ad attitudine lattifera [www.aiab.it; www.itazanelli.it].

La media produttiva della razza rilevata dall'Associazione italiana allevatori (AIA) nell'anno 2004 è stata di 5.680 Kg, con il 3,57% di grasso ed il 3,40% di proteine. Da questi dati si può affermare che la razza Reggiana produce mediamente il 30% in meno della razza Frisona, ma la minor quantità è compensata dalla maggior resa economica, grazie al pagamento latte-qualità [Salza *et al.*, 2005].

La storia della razza Reggiana, infatti, dimostra che il recupero di questa razza è stato possibile solo attraverso il legame con il prodotto principe del suo comprensorio, il “Parmigiano Reggiano delle Vacche Rosse”, sul quale vengono apportati due marchi aggiuntivi a quelli del Parmigiano Reggiano: il marchio “Vacche Rosse, razza Reggiana” di proprietà della Grana d'oro” e il marchio “Razza Reggiana” di proprietà dell'AnaBoRaRe.

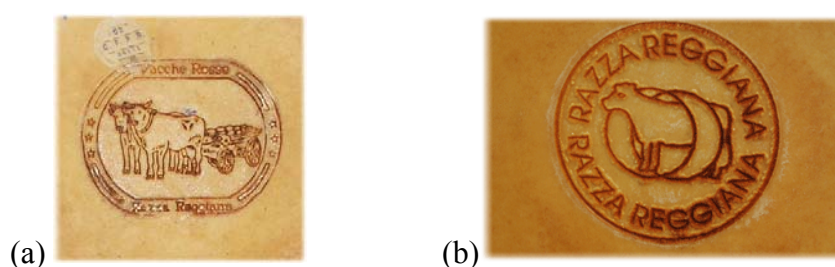


Figura 4. (a) Marchio “Vacche Rosse, razza Reggiana” e (b) marchio “Razza Reggiana”
[Da: www.razzareggiana.it]

CAPITOLO 2

2.1. SECREZIONE E COMPOSIZIONE MACROSCOPICA DEL LATTE

La produzione del latte è regolata da un meccanismo ormonale neuroendocrino che avviene a livello delle cellule secretici mioepiteliali della ghiandola mammaria. Esse sono localizzate attorno agli acini che costituiscono la mammella, le quali versano il loro secreto nei vari lumi, influenzate dalla presenza di ossitocina, che permette la loro contrazione e la fuoriuscita del latte (Fig. 5).

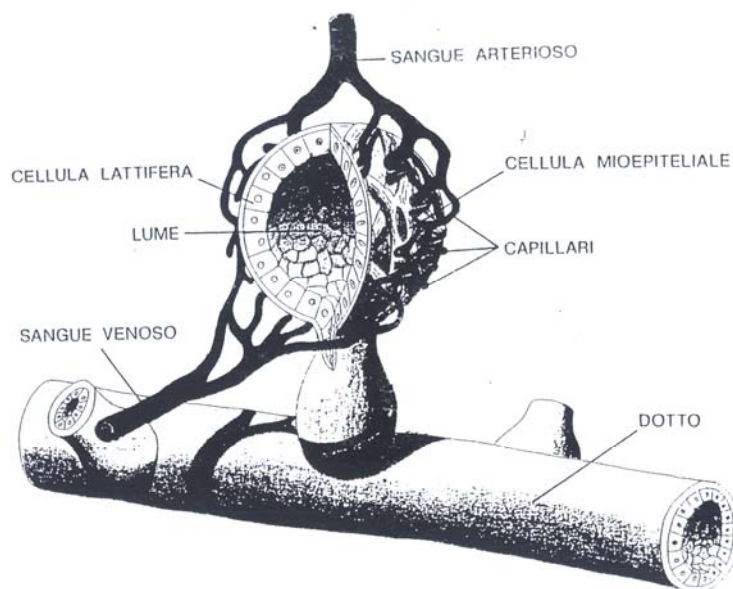


Figura 5. Struttura dell'alveolo della ghiandola mammaria.

Da: Qi P., 2007 (mod.).

Gli acini, a loro volta, confluiscono nella cisterna del latte (seno galattoforo), dalla quale avviene, in assenza di stimoli inibitori, l'eiezione del latte attraverso lo sfintere del capezzolo. Quest'ultima fase è consentita da una regolazione neuro-ormonale ipotalamo-ipofisaria. L'ipofisi posteriore, infatti, contribuisce alla secrezione di ossitocina, che agisce

sui recettori specifici delle cellule mioepiteliali, mentre l'ipofisi anteriore permette la produzione degli ormoni lattogeni, tra cui la prolattina, la somatropina e l'ormone placentario lattogeno. Rilevante è la capacità di sintesi della mammella (lattogenesi), infatti il 92% della sostanza secca, le proteine (caseine, α -lattoalbumina e β -lattoglobulina), i lipidi (trigliceridi), i glucidi (essenzialmente il lattosio) sono sintetizzati a livello della suddetta ghiandola secretoria, partendo da componenti più semplici, gli aminoacidi, il glicerolo, il glucosio che vengono trasportati dal flusso ematico.

Il latte è un prodotto molto importante nell'alimentazione umana e questa sua peculiarità è dovuta alla complessa ed eterogenea composizione, che ne permette diversi utilizzi e ne fa al contempo un alimento completo e variabile.

Il latte infatti è un prodotto complesso con molte sostanze differenti che si trovano sospese o in soluzione [Brunelli, 2008]. È un alimento fondamentalmente composto da acqua, che rappresenta l'87% del peso complessivo e da componenti di varia natura, presenti sia allo stato di soluzione vera (sali, vitamine idrosolubili, sostanze azotate non proteiche, zuccheri), sia allo stato colloidale (proteine e parte dei fosfati e citrati di calcio) e sia allo stato di emulsione (lipidi e vitamine liposolubili). Inoltre, esso contiene altre sostanze di importanza non trascurabile dal punto di vista nutritivo, come vitamine, enzimi, ormoni ed oligoelementi. Questi costituenti del latte sono tra di loro strettamente legati mediante un'interdipendenza più o meno stretta ed in ogni modo, la loro concentrazione è differente a seconda la specie (Tab. 1), la razza, la dieta, il periodo di lattazione, etc. [Salvadori del Prato, 1998; 2005]. La miscela di tutte queste sostanze fa del latte un alimento completo, caratterizzato da un determinato livello energetico e ad alto valore nutritivo, unico nel suo genere.

Tabella 1. Composizione media dei latti di alcune specie.

Specie	Acqua	Residuo secco	Grasso	Lattosio	Sost. azotate	Caseina
	%	%	%	%	%	%
Vacca	87-89	11-13	3,4-3,6	4,6-4,7	3,4-3,6	2,50
Bufala	78-84	16-22	6-9	4,7-4,9	4,4-4,8	3,90
Capra	83-89	11-17	4,3-4,4	4,3-4,7	4,0-4,2	3,00
Pecora	79-82	18-21	5-7	4,5-5,0	5,6-6,0	4,50
Asina	89-90	10-11	1,5	6,7	1,65	0,95
Balena	52-55	45-48	35,0	0,7	10,00	-
Cagna	81-82	18-19	4,0	4,8	9,0	4,50
Cavalla	90-91	9-10	1,1	5,6	2,0	1,25
Coniglia	70-71	29-30	12,0	1,8	13,0	9,00
Donna	87-88	12-13	3,3	6,6	1,40	0,85
Gatta	81-83	17-19	4,0	4,9	9,10	2,80
Renna	66-68	32-34	17,5	2,8	9,90	7,90
Scrofa	82-84	16-18	5,0	3,0	7,20	3,70
Zebù	81-82	18-19	5,2	5,1	4,20	3,30

Da: Salvadori del Prato, 1998.

La caratteristica che rende il latte un alimento così importante è che in esso sono presenti macromolecole indispensabili per una corretta alimentazione (carboidrati, lipidi e proteine), insieme ai micronutrienti. Le proteine, in particolare, hanno un elevato valore biologico e contribuiscono al valore nutrizionale di questo alimento come fonte di azoto e aminoacidi [Brunelli, 2008]. Come è noto, infatti, fra i diversi alimenti funzionali, il latte ha assunto negli ultimi anni un nuovo ruolo come fonte di molecole bioattive, in grado di influenzare alcuni aspetti della salute umana (Tab. 2), in quanto ad alcune proteine e peptidi, originati dalla loro idrolisi, sono state associate proprietà fisiologiche (Tab. 3).

Tabella 2. Le principali proteine bioattive del latte.

Proteine maggiori	Proprietà fisiologiche
Lattoperossidasi	Azione enzimatica
Immunoglobulina	Azione antibatterica
Transferrina	Chelazione dei metalli
β Caseina	Chelazione dei metalli
Proteine minori	Proprietà fisiologiche
Lisozima	Azione enzimatica
Lattoferrina	Chelazione dei metalli
Prolattina	Azione ormonale
Insulina	Azione ormonale
Somatostatina	Azione ormonale
Calcitonina	Azione ormonale
TSH (Thyroid Stimulating Hormone)	Azione ormonale
TRH (Thyrotropin Releasing Hormone)	Azione ormonale
ACTH	Azione ormonale
EGF (Epidermal Growth Factor)	Fattore di crescita
TGF – beta (Transforming Growth Factor)	Citochinine

Da: Bountonnier, 2000 (mod.).

Tabella 3. I principali peptidi bio – attivi estratti dalle proteine del latte.

Peptidi estratti	Proteine	Proprietà fisiologiche
Casomorfine	α e β caseine	Agonista oppioide
α Lattorfina	α lattoalbumina	Agonista oppioide
β Lattorfina	β lattoglobulina	Agonista oppioide
Lattoferroxine	lattoferrina	Antagonista oppioide
Casoxine	κ -caseina	Antagonista oppioide
Casochinine	α_{s1} e β caseine	Anti – ipertensione (inibizione dell'A.C.E.)
Casoplateline	κ - caseina	Anti – ipertensione (inibizione dell'A.C.E.)
Caseinomacropeptide	κ -caseina	Antitrombotico (inibizione della formazione dei coaguli sanguigni per aggregazione delle placche)
Immunopeptidi	α e β caseine	Immunostimolanti (attivazione dei leucociti)
Lattoferricine	lattoferrina	Trasporto dei minerali e immunomodulazione
Fosfopeptidi	α e β caseine	Trasporto dei minerali

Da: Bountonnier, 2000 (mod.).

Un'altra componente rilevante è rappresentata dalla frazione lipidica del latte, che negli ultimi anni è stata oggetto di numerosi studi, focalizzati in particolar modo sulle caratteristiche nutrizionali degli $\omega 3$, $\omega 6$ e CLA e sui possibili effetti benefici di quest'ultimi sulla salute umana, riscontrati attraverso l'impegno della ricerca scientifica in ambito nutrizionale ed alimentare.

La frazione lipidica del latte è pertanto una componente fondamentale dal punto di vista nutrizionale nell'alimentazione umana, ed inoltre, è un elemento chiave nell'ambito della struttura e dell'aroma di molti prodotti lattiero-caseari [Michalski, 2007].

Naturalmente anche le altre componenti del latte (Tab. 4), rappresentate dalla frazione glucidica, vitaminica, minerale ed enzimatica rivestono una notevole importanza

nutrizionale e tecnologica. Nel latte, infatti, troviamo elevati livelli di calcio e di riboflavina (vit. B₂), che coprono la maggior parte dei fabbisogni giornalieri di un individuo e un buon apporto di altre vitamine, come la vitamina A ed E [Paina,1996].

In particolare, in questo lavoro ci focalizzeremo su due frazioni principali, quella proteica e lipidica, e in particolar modo sul polimorfismo genetico delle proteine e sulla composizione in acidi grassi del latte bovino.

Tabella 4. Composizione media del latte bovino.

Composizione	g/L	Stato fisico dei componenti
Acqua	905	Acqua libera (solvente) + acqua legata (3,75)
Glucidi:lattosio	49	Soluzione
Lipidi:	35	Emulsione di globuli di grasso (3-5 micron)
- sostanze grasse propriamente dette;	34	
- lecitina (fosfolipidi);	0,5	
- parte insaponificabile (steroli, caroteni, tocoferoli)	0,5	
Protidi:	34	Sospensione micellare di fosfocaseinato di calcio (0,08-0,12 micron)
- caseina	27	
- proteine solubili (globulina, albumina)	5,5	Soluzione (colloidale)
- sostanze azotate non proteiche	1,5	Soluzione
Sali:	9	Soluzione o stato colloidale (P o Ca)
- dell'acido citrico	2	(Sali di K, Ca, Na, Mg, etc..)

- dell'acido fosforico	
(P ₂ O ₅)	2,6
- dell'acido cloridrico	
(NaCl)	1,7
Costituenti diversi (vitamine, enzimi, gas disciolti)	tracce
Estratto secco (totale)	
Residuo magro	127
	92

Da: Alais, 2000.

2.2. I FATTORI CHE INFLUENZANO LA COMPOSIZIONE DEL LATTE

La composizione del latte può essere influenzata da diversi fattori, che possono incidere sulle caratteristiche dei suoi elementi strutturali e, di conseguenza, sulle proprietà chimico-fisiche del latte stesso. A seconda della loro origine, i fattori di variazione possono essere distinti in endogeni ed in esogeni:

Fattori endogeni:

Genetici: razza
caratteristiche individuali
Fisiologici: stato di salute
stato di lattazione

Fattori esogeni:

Zootecnici: alimentazione
clima
sistema di allevamento
stabulazione
tecniche e intervalli di mungitura

Per quanto riguarda le cause di origine genetica, esiste una variabilità ereditaria individuale della produzione e composizione del latte, caratteristica di ogni singolo animale della stessa razza e nelle stesse condizioni di allevamento. Naturalmente la composizione del latte varia in funzione della razza considerata e in particolar modo, il contenuto di grasso varia moltissimo tra razze e tra individui all'interno della stessa razza [Mariani *et al.* 1987; Alais, 2000]. Infatti sia il tenore in grassi che in proteine del latte sono determinati per il 40 % dalla genetica (ereditabilità) e per il 60 % dell'ambiente, mentre le produzioni di latte, grasso e proteine (kg di grasso e proteine prodotti in lattazione) sono determinate dalla genetica per un 25–30 % e dall'ambiente per un 70–75 % [Salvadori del Prato, 1998]. Le componenti che presentano minore variabilità sono il lattosio e i sali minerali che sono indici utilizzati per l'individuazione di latti normali, anche perché il lattosio è un fattore limitante della capacità di sintesi della mammella e quindi della produzione di latte.

Gli effetti di variazione più significativi della composizione del latte sono quelli connessi con lo stato fisiologico dell'animale, infatti durante il corso della lattazione si verificano cambiamenti nel contenuto di vari componenti [Alais, 2000]. Più specificatamente il grasso e le proteine totali tendono a diminuire fino a raggiungere valori minimi, rispettivamente, al secondo e al quinto mese dall'inizio della lattazione per poi progressivamente aumentare a mano a mano che ci si avvicina alla fine del ciclo. La curva di produttività al contrario ha un andamento opposto a quello del grasso e delle proteine, raggiungendo il suo massimo fra il primo e il terzo mese. Le variazioni che si riscontrano maggiormente durante il ciclo di lattazione sono visibili nei primi e negli ultimi giorni della lattazione stessa. Immediatamente dopo il parto, e per i primi 3–4 giorni, l'animale produce il colostro, un liquido che non ha ancora le caratteristiche del latte vero e proprio, essendo più ricco di tutti i componenti (soprattutto di immunoglobuline), ad eccezione di lattosio, potassio, azoto non proteico e acqua. La sua composizione tende a mutare velocemente e le variazioni durante le successive fasi della lattazione avvengono soprattutto a carico delle proteine, del fosforo, del calcio e del residuo magro che, dopo un'iniziale diminuzione, tendono a rimanere costanti per aumentare al termine della lattazione [Strzalkowska *et al.*, 2002]. In quest'ultima fase il latte, oltre ad avere un più elevato contenuto di materia secca totale per maggiori tenori di grasso, proteine e ceneri, presenta delle variazioni anche nella componente salina, la quale è ricca di calcio e sodio

ed è povera di potassio e fosforo. Inoltre per il variare degli equilibri calcio/fosforo il latte a fine lattazione ha una minore stabilità ai trattamenti termici.

La composizione del latte risente anche dello stato di salute dell'animale, infatti i fenomeni mastitici provocano una diminuzione e un'alterazione della produzione di latte. Tali patologie provocano un aumento nel latte delle cellule somatiche, proporzionale all'intensità del fenomeno infettivo, con conseguente arricchimento di enzimi di origine cellulare, oltre all'aumento delle immunoglobuline. La mastite provoca inoltre una diminuzione della capacità di sintesi della ghiandola mammaria, con conseguente diminuzione di grasso, caseina, lattosio ed un aumento dei prodotti di filtrazione diretta dal plasma sanguigno (sieroproteine, sali minerali, enzimi, etc.), determinato da una maggiore permeabilità dei capillari [Corradini, 1995]. Le mastiti inoltre rappresentano la principale fonte di profonde alterazioni, non solo a livello di composizione quanto piuttosto nei riguardi dell'attitudine alla coagulazione [Mariani *et al.*, 1987]. Infine nel loro insieme tutte le variazioni di composizione provocano un aumento del pH del latte, spesso superiore a 6,8 (6,6 – 6,65 nel latte normale).

I fattori ambientali possono esercitare influenze diverse sulla produzione e sulla composizione del latte durante il corso della lattazione delle bovine [García *et al.*, 2001], in particolar modo se quest'ultimo è ottenuto in montagna o in pianura [Collomb *et al.*, 2002]. Le variazioni stagionali ad esempio comportano un incremento del grasso, del residuo magro, delle proteine e dei sali minerali nel periodo invernale. Mentre per temperature ambientali, comprese tra 0 e 29°C, la composizione percentuale dei costituenti del latte non mostra variazioni significative, al contrario per temperature superiori ai 30 °C diminuisce il livello di produzione, il contenuto proteico, il residuo magro ed il lattosio. Inoltre in determinate condizioni ambientali si possono verificare perdite di produzione, come ad esempio, il caldo eccessivo provoca una maggiore frequenza di latti ipoacidi. L'effetto dei valori ambientali non è però uguale per tutti i componenti del latte, infatti sul lattosio e sui sali minerali è praticamente trascurabile, mentre le percentuali di grasso e proteine possono essere modificate rispettivamente di 2-3 punti decimali (es. da 3,5 a 3,7%) e di 0,1–0,4 decimali in concomitanza con i fattori nutrizionali [Salvadori del Prato, 1998]. Anche l'alimentazione quindi detiene un ruolo fondamentale, sebbene i cambiamenti nella composizione del latte possono anche essere influenzati attraverso le tecniche di allevamento e di gestione, l'alimentazione è in grado

di indurre più rapidamente cambiamenti nella direzione voluta [Fredeen, 1996]. È noto che, la sintesi della caseina nel latte è limitata dalla disponibilità degli aminoacidi essenziali, che a loro volta, variano con lo stadio di lattazione e con la composizione della dieta. Infatti, un corretto rapporto energia/proteine può favorire la sintesi di aminoacidi e proteine, mentre impiegando i corretti equilibri tra le quantità di foraggio e concentrati somministrati si può favorire la produzione di lipidi (questa produzione può essere influenzata anche dalla quantità di fibra presente nella dieta) [Chilliard *et al.*, 2000]. Di particolare interesse è anche l'influenza che il bilancio energetico (Tab. 5) della razione può esercitare, oltre che sulla quantità di grasso prodotta, anche sulla composizione dei lipidi.

Tabella 5. Effetto del bilancio energetico della razione sulla composizione centesimale acidica del grasso del latte.

Acidi grassi	Livello energetico		
	100%	75%	50%
Butirrico	6,9	7,1	6,5
Caproico	3,4	3,1	2,3
Caprilico	1,8	1,4	1,0
Caprico	4,1	1,9	1,8
Somma 4:0-10:0	16,2	14,5	11,6
Laurico	4,9	3,1	1,9
Miristico	13,3	11,5	8,5
Palmitico	39,1	33,4	28,3
Somma 12:0-16:0	57,3	48,0	38,7
Stearico	7,2	7,8	7,9
Oleico	16,6	26,5	38,3
Linoleico	1,9	1,9	2,2
Linolenico	0,8	1,3	1,3
Somma 18:0-18:3	26,5	37,5	49,7

Da: Corradini, 1995.

I componenti lipidici della dieta possono influire direttamente sulla composizione percentuale di grasso, mentre il livello energetico della razione può modificare le attività fermentative ruminali che determinano la disponibilità di precursori per la sintesi dello stesso grasso e la secrezione degli ormoni che regolano il metabolismo lipidico [Corradini, 1995].

Infine anche i fattori tecnologici, quali le operazioni di mungitura, possono variare la composizione del latte. Infatti il tenore di grasso del latte aumenta sensibilmente nel corso della stessa mungitura, o nel caso di modificazione dell'intervallo tra due mungiture e in tal caso, se si effettua una mungitura incompleta si ottiene un latte più povero di grasso [Alais, 2000].

CAPITOLO 3

3.1. LA FRAZIONE PROTEICA DEL LATTE BOVINO

Le proteine del latte rivestono una grande importanza dal punto di vista nutrizionale, in quanto, come abbiamo visto, conferiscono al latte un elevato valore biologico. Hanno una digeribilità molto elevata, contengono aminoacidi essenziali, cioè aminoacidi che l'organismo non è in grado di sintetizzare autonomamente, e grazie alle loro proprietà funzionali influenzano le caratteristiche tecnologiche del latte. Nel latte il contenuto proteico è circa il 3,2%, ma la distribuzione media delle principali sostanze azotate varia a seconda della specie presa in considerazione (Tab. 6). Nel caso del latte vaccino considerando 100% l'azoto totale è possibile rilevare un 78% di azoto caseinico, un 17% di azoto sotto forma di proteine del siero ed un 5% di sostanze azotate non proteiche (urea, aminoacidi liberi, peptidi ammoniaci) [Salvadori del Prato, 2005].

Tabella 6. Distribuzione media delle frazioni azotate nel latte bovino caprino e ovino.

% di	Vacca		Capra		Pecora	
	proteina	proteina	proteina	proteina	proteina	proteina
	grezza	vera	grezza	vera	grezza	vera
	(n*6,38)	(N-NPN)6,38	(N*6,38)	(N-NPN)6,38	(N*6,38)	(N-NPN)6,38
Caseina	77,8	82,0	75,6	82,7	78,5	82,4
Proteine del siero	17,0	18,0	15,7	17,3	16,8	17,6
N.P.N.	5,2	-	8,7	-	4,7	-

Da: Salvadori del Prato, 2005.

Le proteine, dal greco “*protos*” che vuol dire “primo” perché sono le sostanze primarie degli esseri viventi, sono costituite da aminoacidi legati tra di loro da un legame covalente, il legame peptidico. L’ordine in cui sono legati gli aminoacidi determina la struttura primaria della proteina e quindi, di conseguenza, le sue proprietà funzionali. In particolare la struttura primaria è data appunto dalla sequenza degli aminoacidi, mentre la struttura secondaria è dovuta alle molecole proteiche che possiedono una determinata conformazione spaziale (α -elica o β a fogli ripiegati) e tali strutture sono rese stabili con legami idrogeno. Nella struttura terziaria e quaternaria, la proteina può essere formata da una unica catena ripiegata su se stessa o da più catene e la rigidità viene assicurata principalmente da ponti disolfuro. La sequenza aminoacidica infatti è determinata dal codice genetico e in base a questa sequenza, la proteina si ripiega su se stessa con una conformazione tridimensionale caratteristica (Fig.6) [Brunelli, 2008].

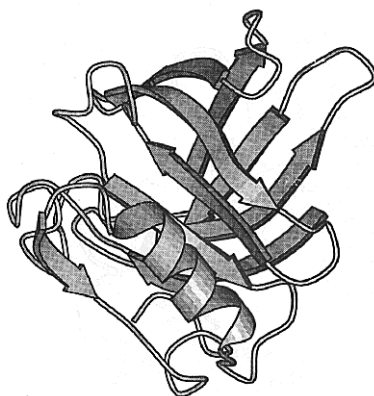


Figura 6. Struttura tridimensionale della β -lattoglobulina.

Da: www.google.it.

All’interno delle cellule epiteliali della mammella, che costituiscono l’alveolo (o acino), il pool aminoacidico viene assemblato in proteine secondo precise informazioni genetiche fornite dal nucleo delle cellule. Appena sintetizzate sui ribosomi, penetrano nel reticolo endoplasmatico e migrano verso l’apparato del Golgi, in cui si realizzano le modificazioni molecolari che portano all’aggiunta di gruppi fosforici e glicosidici alle caseine. Infine da questa struttura cellulare si staccano vacuoli contenenti le proteine neosintetizzate, che

migrano verso il polo apicale della cellula epiteliale e riversano il loro contenuto proteico nel lume dell'acino [Qi, 2007].

Nel latte esistono due importanti categorie di proteine: l'80% è rappresentata dalla frazione delle caseine e il 20% dalle proteine del siero (Tab. 7).

Tabella 7. Proteine presenti nel latte bovino.

	g/L	%
Proteine totali	33	100
Caseine totali	26	79,5
Caseina α 1	10	30,6
Caseina α 2	2,6	8,0
Caseina β	9,3	28,4
Caseina κ	3,3	10,1
Caseina γ	piccole quantità	
Proteine totali del siero	6,3	19,3
α lattoalbumina	1,2	3,7
β lattoglobulina	3,2	9,8
Siero albumina bovina	0,4	1,2
Immunoglobuline	0,7	2,1

Da: Brunelli, 2008 (modificata).

La caseina (dal latino “*caseus*”= formaggio) rappresenta la materia prima, il vero e proprio fulcro dell'intero processo di caseificazione [Mariani *et al.*, 1991].

È presente nel latte sotto forma di particelle sferiche, conosciute come micelle caseiniche con diametro variabile da 30 a 300 nm. Il numero di queste micelle è estremamente elevato, pari a 10^{14} /ml. Le micelle presentano pertanto una notevole superficie di reazione ($4 \text{ m}^2/\text{ml}$ di latte) e risultano molto sensibili alle variazioni del mezzo. Le loro proprietà naturalmente influenzano in modo determinante il comportamento del latte durante i processi tecnologici, come i trattamenti termici e la caseificazione. I primi possono essere

applicati in base alla stabilità della fase colloidale, costituita appunto dalle micelle, mentre la seconda dipende dalla destabilizzazione, che provoca il passaggio della dispersione colloidale dallo stato di solido a quello di gel con idonee proprietà reologiche.

Le micelle hanno inoltre una componente minerale relativamente elevata, tra il 7–8 % sul secco, costituita per il 90 % da fosfato di calcio. Esse presentano un aspetto spugnoso e poroso, composte da un gran numero di sub-unità con diametro di circa 12 – 20 nm, che prendono il nome di submicelle. Infatti allo stato nativo la caseina è costituita dalle frazioni α_{s1} , α_{s2} , β e κ in vario modo strutturate in submicelle. Queste a loro volta, con il concorso determinante del fosfato colloidale si aggregano in unità più grandi di varia dimensione [Mariani *et al.*, 1991]. A seconda della specie considerata (Tab. 8), le proporzioni delle diverse caseine variano in un ampio range [Qi, 2007].

Tabella 8. Distribuzione caseinica (%) in diversi tipi di latte.

	α_{s1}	α_{s2}	β	κ
Caprino	da 5 a 17	da 6 a 20	50	15
Bovino	38	10	40	12
Uomo	tracce	tracce	70	27

Da: Qi P., 2007.

In passato si pensava che la caseina fosse una singola frazione proteica, ma successivamente sono stati identificati distinti gruppi di proteine, sulla base della loro diversa velocità elettroforetica sintetizzate a livello della ghiandola mammaria.

Le caseine, pertanto, sono costituite da aggregati etero – proteici fosforilati presenti nel latte allo stato micellare, che possono essere separate per acidificazione (pH 4,6), ultracentrifugazione e coagulazione enzimatica. Esse quindi sono fosforilate, hanno cioè fosforo organico (acido fosforico esterificato con la serina), il cui numero di atomi varia fra le diverse frazioni caseiniche:

Caseina	Atomi di fosforo
α_{s1}	8 - 9
α_{s2}	10 - 13
β	(4) 5
κ	1 – 2

Pertanto la stabilità delle strutture viene raggiunta con l'intervento del calcio e dei fosfati, i quali si legano ai gruppi $R - COO^-$ ed agli $R - NH_3^+$ [Salvadori del Prato, 1998].

I complessi così formati si associano mediante l'intervento di calcio e fosforo (legando internamente le due caseine α e β), fino a formare una micella sulla quale la κ caseina, più idrofila, si dispone esternamente assumendo la funzione di colloide protettore. La κ -Cn, infatti, differisce dalle altre caseine, in quanto è solubile in un ampio range di concentrazione di ioni di calcio ed ha, pertanto, la funzione naturale di mantenere le micelle in sospensione, ponendosi come interfaccia tra le caseine calcio-sensibili e l'ambiente acquoso [Creamer *et al.*, 1998]. E' questa condizione che ha portato Waugh e von Hippel ad assegnare a quest'ultima, il ruolo di stabilizzare nel complesso la micella caseinica [Kumosinski *et al.*, 1991].

Naturalmente il calcio e il fosforo colloidali ed inorganici sono in equilibrio nel latte, ma tale equilibrio è instabile e dinamico perché è influenzato dal pH e dalla temperatura. Le micelle caseiniche inoltre trattengono acqua attraverso gli zuccheri della κ caseina che li avvolge, rendendo stabile la loro distribuzione nel plasma latteo, caratteristica da cui dipende l'integrità del latte stesso. Occorre pertanto un elevatissimo grado di idratazione, per permettere alle micelle di restare in dispersione e non interagire, mantenendo a livelli appropriati il pH e gli zuccheri idrofili all'esterno delle micelle. Se quest'ultime condizioni variano, lo stato di idratazione non è più sufficiente e le micelle interagiscono flocculando o coagulando. In particolare la κ caseina, distribuita per lo più nella parte superficiale della micella, rappresenta l'elemento di massima stabilità dell'intera struttura [Mariani *et al.*, 1991]. Nello stesso tempo, però, ne costituisce anche il punto debole, in quanto substrato specifico dell'azione del caglio. In particolar modo è sensibile all'azione dell'enzima proteolitico chimosina (enzima estratto dal quarto stomaco del vitello) che rompe il legame peptidico 105-106 (fenilalanina-metionina) della molecola liberandone, rispettivamente, la para- κ -caseina e la porzione terminale fortemente idrofila, il caseinomacropeptide o glicomacropeptide. Il suo distacco fa perdere alla κ caseina la funzione di colloide protettore delle micelle caseiniche, diminuiscono le forze repulsive e lo stato di idratazione delle micelle decresce, permettendo interazioni reciproche tra i gruppi idrofobici che portano alla coagulazione del latte. Pertanto le micelle si destabilizzano e prendono avvio i processi di disidratazione dell'intero sistema. Nelle

associazioni tra le molecole delle caseine giocano un ruolo importante gli ioni calcio, i quali riducono la carica negativa delle molecole rendendo possibile tale associazione a temperature non inferiori a 15 °C.

Si tratta quindi di fenomeni tra loro strettamente interconnessi, che rappresentano il motivo conduttore della fase centrale e fondamentale dell'intero processo di caseificazione. La loro evoluzione dipende da numerosi fattori intrinseci ed estrinseci: pH e acidità del latte, contenuto di caseina, proporzioni delle singole caseine, varianti genetiche, dimensione delle micelle, concentrazione di ioni calcio e di fosfato di calcio colloidale, acidificazione in caldaia, quantità di caglio, temperatura di coagulazione, tempo di rassodamento, tempi e modalità di lavorazione della cagliata, modalità di spinatura, curve termiche, temperature di cottura, tempi di lavorazione, etc. [Mariani *et al.*, 1991].

Analizzando le differenti caseine, possiamo dire brevemente che [Farrell *et al.*, 2004]:

- La caseina α_{s1} è una fosfoproteina composta da una singola catena polipeptidica di 199 aminoacidi, costituisce circa il 40 % della frazione caseinica del latte bovino ed è sensibile al calcio. È priva di cistina e cisteina e il suo aminoacido carbossi-terminale è il triptofano.
- La caseina α_{s2} invece è composta da una catena polipeptidica di 207 aminoacidi, costituisce circa il 10% della frazione caseinica e il carbossi-terminale è la leucina.
- La caseina β formata da una catena polipeptidica di 209 aminoacidi è anch'essa priva di cistina e cisteina, costituisce circa il 37% della frazione caseinica e il suo carbossi terminale è la valina. Questa caseina è meno sensibile al calcio della α_s , ma è la caseina più idrofobica. Quest'ultima mostra tre legami fortemente plasmino-sensibili, Lys²⁸-Lys²⁹, Lys¹⁰⁵-His¹⁰⁶ e Lys¹⁰⁷-Glu¹⁰⁸, con conseguente formazione di γ -caseina e residui N-terminali (proteoso-peptoni, PP). Infatti per idrolisi post-secretoria l'enzima plasmina scinde il legame lisina-lisina e in base al sito in cui agisce l'enzima, si ottengono i diversi proteosi-peptoni e le γ caseina [Bastian *et al.*, 1996; Crudden *et al.*, 2003; Crudden *et al.*, 2005]:

Proteoso – peptoni	aminoacidi	caseina	aminoacidi
Proteoso – peptone (8 fast)	1 – 28	γ_1	29 – 209
Proteoso – peptone 5	1 – 105	γ_2	106 – 209

Proteoso – peptone (8 slow)	29 – 105	γ_3	108 – 209
--------------------------------	----------	------------	-----------

Le destinazioni di entrambi naturalmente sono diverse, infatti i proteoso-peptoni si ritrovano nel siero, mentre le γ caseina nella cagliata.

- La κ caseina rappresenta circa il 13% della caseina [Kumosinski *et al.*, 1991], è la sola fosfo-glicoproteina tra le caseine e la sua componente zuccherina è costituita da acido N-acetilneuraminico, galattosio e N-acetilgalattosamina. Essa è composta da una catena polipeptidica di 169 residui aminoacidi, con la valina che rappresenta l'aminoacido carbossi-terminale. È stato dimostrato che il grado di glicosilazione della κ -Cn nel latte è altamente variabile tra e all'interno delle bovine. I fattori che lo influenzano sono: il numero dei parti, lo stadio di lattazione, la quantità delle cellule somatiche e il fenotipo della κ -Cn [Robitaille *et al.*, 1991].

Un'altra frazione azotata molto importante è rappresentata dalle sieroproteine, la quale comprende il 17% circa delle sostanze azotate del latte di bovina e denominate anche proteine solubili [Salvadori del Prato, 2005]. In particolare l' α -lattoalbumina (α -La) e la β -lattoglobulina (β -Lg) presentano un bilanciato profilo nutrizionale, in quanto sono costituite da una quantità elevata di aminoacidi solforati (metionina, cistina e cisteina) ed hanno una serie di proprietà funzionali, che includono la capacità di formare e stabilizzare gels, emulsioni e schiume [Davis *et al.*, 2004], ed è proprio per queste caratteristiche che, già allo stato nativo, possono trovare utili impieghi in preparazioni alimentari [Corradini, 1998; Lefèvre *et al.*, 2000].

Si distinguono dalla caseina per il minor peso molecolare, che non permette la precipitazione di queste proteine al punto isoelettrico. Le sieroproteine infatti non sono degli aggregati proteici, ma sono presenti nel latte come monomeri o polimeri che precipitano non per azione enzimatica, ma per trattamento acido-termico o per modificazioni degli equilibri salini. Queste proteine non contengono fosforo, sono semplici, solubili in acqua pura (albumine) o in soluzioni saline molto diluite (globuline). Si possono distinguere (su 100 parti):

- albumine 70 %
- globuline 15 %
- proteoso – peptoni 10 %

- metalloproteine et al. 5%

Le metalloproteine comprendono la lattoferrina, la transferrina e la ceruplasmina, importanti nella fissazione e nel trasporto dei metalli pesanti.

Le albumine sono costituite da:

- β lattoglobulina (β -Lg)	PM 18.000	45 %
- α lattoalbumina (α -La)	PM 14.000	15 %
- albumina del siero di sangue (SA)	PM 70.000	10 %

Le globuline comprendono:

- euglobuline	PM 150.000	7,5 %
- pseudoglobuline	PM 150.000	7,5 %

Quest'ultime includono anche le immunoglobuline (Ig), particolarmente abbondanti nel colostro, le quali raggiungono una concentrazione di 0,5 g/L di latte con un tenore di azoto intorno all' 1–2 % dell'azoto totale del latte. Esse assieme all'albumina del siero di sangue sono filtrate direttamente dal sangue, mentre le α lattoalbumine e le β lattoglobuline sono di sintesi mammaria.

Pertanto le maggiori componenti della frazione delle sieroproteine sono rappresentate da β -Lg, α -La, siero albumina (SA), Ig e proeoso-peptoni.

La β lattoglobulina è una catena peptidica di 162 aminoacidi ed è la più rappresentata tra le proteine del siero rintracciata nel latte dei ruminanti [Ballester *et al.*, 2005]. Il latte bovino ne contiene circa 2–3 g/L con un tenore di azoto equivalente al 7–12 % dell'azoto totale del latte (le variazioni dipendono dalla razza considerata, dall'alimentazione e dallo stadio di lattazione) [Kontopidis *et al.*, 2004]. In particolare, la β -Lg è una proteina globulare, con una zona idrofobica esposta al solvente in grado di legare, al suo interno, una varietà di molecole idrofobiche, come gli acidi grassi (acido palmitico), retinoidi (es. vitamina A), vitamina D₂ e steroidi (colesterolo) [Papiz *et al.*, 1987; Brownlow *et al.*, 1997; Jameson *et al.*, 2002; Farrell *et al.*, 2004].

L' α lattoalbumina è costituita da una catena peptidica di 123 aminoacidi ed è presente nel latte intorno a 1,2 – 1,5 g/L con un tenore in azoto corrispondente al 2–5 % dell'azoto totale del latte. Questa sieroproteina ha una specifica e definita funzione fisiologica nella ghiandola mammaria. All'interno dell'apparato del Golgi delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria, l' α -La interagisce con l'enzima β -1,4-galattosiltransferasi per consentire la formazione dell'enzima lattosio-sintetasi. Nello specifico, l' α -La modifica la

specificità del substrato β -1,4-galattosiltransferasi permettendo la formazione del lattosio dalle molecole di glucosio e UDP-galattosio [Bleck *et al.*, 1993; Farrell *et al.*, 2004]. In un secondo momento, l' α -La e il lattosio, prodotto dal complesso (circa 5%), vengono secreti nel latte [Bleck *et al.*, 1993]. Un'altra caratteristica dell' α -La è la capacità di legare il calcio, lo zinco e altri metalli. La concentrazione di questa sieroproteina nel latte decresce in prossimità della fine della lattazione delle bovine e nei soggetti con infezioni alla ghiandola mammaria [Farrell *et al.*, 2004].

Le prime a destabilizzarsi e precipitare a seguito di fenomeni che alterano la stabilità del siero, come l'aggiunta di sali o per riscaldamento, sono le globuline che hanno una scarsa velocità elettroforetica dato il loro elevato peso molecolare, seguite successivamente dalle albumine del siero di sangue, dalla β lattoglobulina e infine dalla α lattoalbumina. Le sieroproteine infatti sono ricche di ponti disolfuro (S-S), che per mezzo di riscaldamento si scindono, formando gruppi SH che creano un ambiente riducente. In seguito con il distacco dei gruppi SH, si origina l'idrogeno solforato (H_2S), che impartisce un tipico odore di cotto. Sempre a causa del riscaldamento può verificarsi un'altra reazione, che consiste nell'interazione fra la κ caseina e la β lattoglobulina, mediante ponti disolfuro [Hill *et al.*, 1997]. Questa reazione ostacola l'azione del caglio sulla κ caseina ed è per questo motivo che latti sottoposti a riscaldamento coagulano meno bene dei latti non trattati termicamente o non coagulano, come nel caso del latte sterilizzato o bollito.

Analizzando infine, le proprietà funzionali delle proteine del latte, esse dipendono dalle caratteristiche strutturali e subiscono l'influenza di fattori chimico – fisici ed enzimatici (Tab. 9).

Tabella 9 Principali proprietà funzionali delle proteine del latte.

Proprietà	Caseine	Sieroproteine
Solubilità	Insolubili a pH 4,6	Molto solubili a tutti i pH. Insolubili a pH 5 se termodenaturate.
Viscosità	Soluzioni molto vischiose a pH neutro o alcalino. Viscosità minima al punto isoelettrico.	Soluzioni poco vischiose, salvo quando denaturate col calore.

Idratazione	Elevata riduzione di acqua con formazione di colla alle alte concentrazioni.	La ritenzione di acqua aumenta con la denaturazione.
Gelificazione	Nessuna gelificazione termica salvo che in presenza di calcio. Gelificazione delle micelle per azione della chimasi.	Termogelificazione a partire da 70°C con influenza del pH e dei sali.
Proprietà emulsionanti	Eccellenti proprietà emulsionanti, soprattutto a pH neutro e alcalino.	Buone proprietà emulsionanti salvo a pH 4 e 5, se vi è denaturazione.
Proprietà schiumogene	Buon accrescimento di volume, ma debole stabilità della schiuma.	Buon accrescimento di volume ed eccellente stabilità delle schiume.
Ritenzioni di aromi	Buona ritenzione.	Ritenzione molto variabile con lo stato di denaturazione

Da: Corradini, 1995.

3.2. IL POLIMORFISMO GENETICO DELLE PROTEINE

Considerando ora l'aspetto genetico, possiamo dire che l'eterogeneità delle frazioni azotate dipende, oltre che dal grado di fosforilazione o di glicolisazione (ad eccezione delle sieroproteine), anche dal polimorfismo genetico.

Il termine polimorfismo indica l'esistenza nell'ambito di una popolazione di più di un allele per un dato *locus* con frequenza superiore all'1%. In genetica, per allele si intende ogni forma vitale di DNA codificante per lo stesso gene: in altre parole, l'allele è responsabile della particolare modalità con cui si manifesta il carattere ereditario controllato da quello specifico gene.

Ciascun individuo definito diploide, come gran parte dei viventi, possiede per ciascun carattere, ovvero per ciascun gene, due alleli, ossia due copie; ognuno dei due alleli è presente su uno stesso *locus* (posizione), su ciascuno dei due cromosomi che costituiscono, nella cellula, una coppia di omologhi. Nel caso in cui, sui cromosomi omologhi è presente una duplice copia dello stesso allele, si dice che l'individuo è omozigote per quel carattere; se gli alleli sono differenti, l'individuo è detto eterozigote. Ogni carattere, all'interno di una popolazione, può essere rappresentato anche da molti alleli (sebbene ogni individuo ne possa portare solo due). L'insieme degli alleli presenti in una popolazione è detto pool genico. La variabilità della frequenza con cui gli alleli compaiono nel pool è l'oggetto di studio della branca della genetica detta genetica di popolazione. Non tutti gli alleli determinano un effetto visibile nell'individuo che ne è portatore. Se il carattere da essi controllato si manifesta, si parla di alleli dominanti; in caso contrario si parla di alleli recessivi. Un individuo può essere quindi omozigote dominante, se possiede due alleli dominanti; eterozigote, se possiede due alleli differenti; omozigote recessivo, se possiede entrambi gli alleli recessivi. Un allele dominante sarà espresso sempre, anche se l'individuo è eterozigote. Un allele recessivo potrà essere espresso solo in individui omozigoti recessivi. L'insieme dei caratteri visibili in un organismo prende il nome di fenotipo, mentre l'insieme del suo corredo di geni (comprendente quindi alleli dominanti e recessivi) è detto genotipo. Per convenzione, gli alleli sono indicati da una singola lettera, maiuscola per indicare l'allele dominante (ad esempio A) e minuscola per l'allele recessivo (ad esempio a). Gli eterozigoti (Aa) e omozigoti (AA) per un determinato gene hanno un fenotipo A, poiché mostrano l'effetto dell'allele dominante, mentre gli omozigoti (aa) mostrano l'effetto dell'allele recessivo e hanno fenotipo a.

Le proteine del latte che presentano il fenomeno del polimorfismo genetico sono le caseine α_{s1} , α_{s2} , β e κ e tra le sieroproteine l' α -lattoalbumina e la β -lattoglobulina. L'identificazione delle diverse varianti si effettua mediante elettroforesi in idonee condizioni di pH e molarità, poiché la maggior parte delle mutazioni sono causate da cambiamenti delle cariche elettriche delle proteine e pertanto, possono essere identificate attraverso le tecniche elettroforetiche [Recio *et al.*, 1997; Amigo *et al.*, 2000]. L'elettroforesi, infatti, è una tecnica analitica separativa, basata sul movimento di particelle elettricamente cariche immerse in un fluido per effetto di un campo elettrico applicato mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso. Tra le tecniche elettroforetiche

attualmente impiegate, troviamo l'elettroforesi su gel di agarosio (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE), l'elettroforesi su gel di poliacrilammide, l'elettroforesi bidimensionale, la SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), l'elettroforesi capillare (CE). In particolare, il compito del materiale di supporto su cui vengono fatte "correre" le molecole è quello di eliminare le correnti convettive limitando la diffusione, in modo tale che i campioni separati siano contenuti in zone ristrette. In generale si tratta di materiali porosi, che vengono opportunamente bagnati nel tampone di corsa all'interno del quale si ha l'elettroforesi. I primi supporti utilizzati erano costituiti da carta da filtro o da strisce di acetato di cellulosa, imbevute nel tampone di corsa. Attualmente questi sono poco usati, anche se, per certe applicazioni, trovano ancora impiego. L'utilizzo dei gel invece, come materiale di supporto per elettroforesi, ha portato ad un rapido miglioramento nei metodi di analisi delle macromolecole. Il primo gel ad essere usato fu quello di amido, ma oggi, per la maggior parte delle tecniche elettroforetiche, si utilizzano gel di agarosio o di poliacrilammide. Inoltre oggi con l'impiego di queste nuove tecniche e della PCR (Polymerase Chain Reaction), tecnica molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di DNA dei quali si conoscano le sequenze iniziali e terminali, è possibile ottenere un profilo proteico analizzando direttamente il sangue o i peli degli animali e non solo il latte, come accadeva in passato.

Oltre alle tecniche elettroforetiche, altri metodi sono stati impiegati per analizzare la frazione proteica del latte, come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) attraverso scambio ionico, interazioni idrofobiche e metodi fase-inversa, combinazione della mappatura peptidica, spettrometria di massa e combinazioni di questi, al fine di identificare le varianti genetiche che non sono state determinate attraverso i metodi elettroforetici, in particolar modo, nel momento in cui non si verificano cambiamenti delle cariche elettriche delle stesse [Burr *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 1997; Bonfatti *et al.*, 2008].

Pertanto, per quanto riguarda la frazione proteica del latte, con il termine polimorfismo (dal greco, letteralmente, "l'avere molte forme") si intende la presenza di molte forme genetiche (Fig. 7) di una stessa proteina, che si distinguono tra loro per la sostituzione o la delezione di alcuni aminoacidi all'interno della catena polipeptidica [Martin *et al.*, 1999; Alais, 2000].

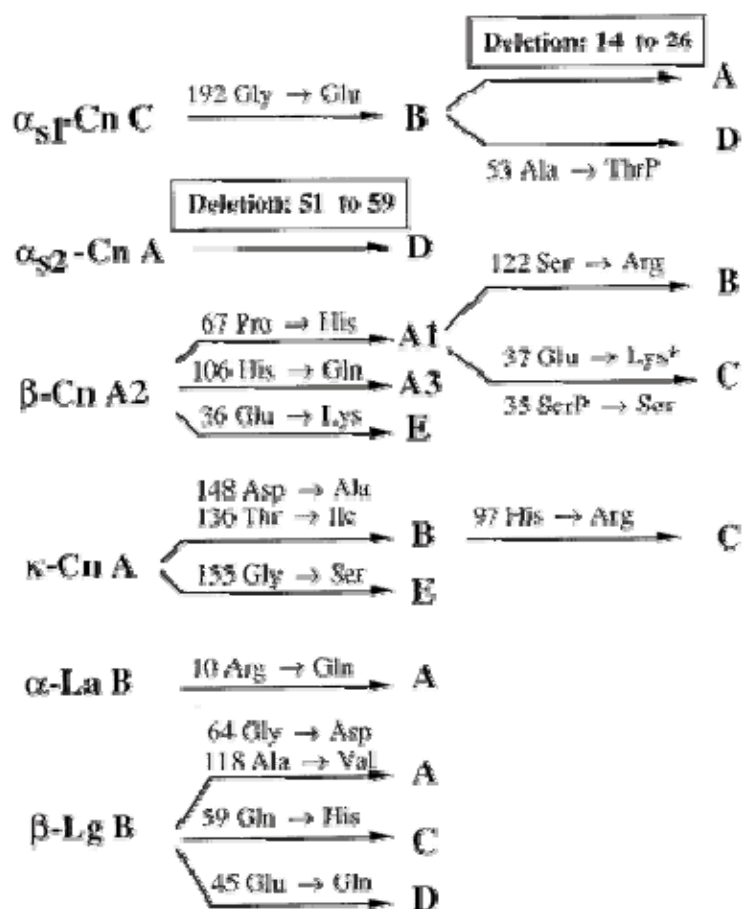


Figura 7. Polimorfismo genetico e relazione filogenetica tra le varianti di sei principali proteine del latte bovino. I numeri indicano la posizione a livello della quale avvengono i punti di mutazione o delezione all'interno della catena peptidica.

Da: Martin *et al.*, 1999

Il polimorfismo delle proteine del latte determina differenze della struttura molecolare delle proteine, che a loro volta si traducono in differenze delle proprietà fisico-chimiche e biologiche delle proteine in questione e delle caratteristiche tecnologiche del latte [Bovenhuis *et al.*, 1992; Macheboeuf *et al.*, 1993; Nuyts-Petit *et al.*, 1997]. La frequenza delle varianti genetiche di ogni proteina del latte considerata varia con la specie e con la razza. Ad esempio nelle diverse razze lattifere allevate nel comprensorio del Parmigiano Reggiano si osservano nette differenze a livello delle frequenze dei tre genotipi della κ -Cn tra le razze locali e la razza Frisona, in quanto la variante B oscilla tra il 21 ed il 24,8%

nelle prime e tra il 5,2 e il 9,9% nella Frisona [Mariani *et al.*, 1971; Mariani, 1975; Losi *et al.*, 1973].

Dalla prima scoperta delle varianti genetiche sulla β -Lg compiuta da Aschaffenburg e Drewry [1955] sono state effettuate molte ricerche sul polimorfismo genetico delle proteine del latte e in particolar modo, la maggior parte dello studio in questo campo è stato effettuato sulla specie bovina [Martin *et al.*, 1999].

Dal 1984 [Eigel *et al.*, 1984] al 2004 [Farrell *et al.*, 2004] sono state identificate nuove varianti genetiche nel latte bovino sia a livello delle caseine che delle sieroproteine (Tab.10).

Tabella 10. Le varianti genetiche delle proteine del latte bovino.

Proteine	Varianti genetiche
α_{s1} -Cn	A, B, C, D, E, F, G, H
α_{s2} -Cn	A, B, C, D
β -Cn	A ¹ , A ² , A ³ , B, C, D, E, F, G, H ¹ , H ² , I
κ -Cn	A, B, C, E, F ¹ , F ² , G ¹ , G ² , H, I, J
β -Lg	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W
α -La	A, B, C

In particolare per l' α_{s1} -Cn sono state identificate 3 nuove varianti genetiche: α_{s1} -Cn F [Erhardt, 1993], α_{s1} -Cn G [Mariani *et al.*, 1995] e α_{s1} -Cn H [Mahé *et al.*, 1999].

Anche per la β -Cn, oltre alle varianti genetiche già individuate (A¹, A², A³, B, C, D, E) e riportate nella precedente revisione [Eigel *et al.*, 1984] sono state identificate nuove varianti: β -Cn F, precedentemente definita β -Cn X [Visser *et al.*, 1995], β -Cn G [Dong *et al.*, 1998], β -Cn H¹ [Han *et al.*, 2000], β -Cn H² [Senocq *et al.*, 2002] e infine la variante I, determinata da Jann *et al.* [2002]. In uno studio in particolare, è risultato che la variante A¹ sia aterogenica rispetto alla variante A², in quanto i risultati ottenuti suggeriscono l'esistenza di una stretta relazione tra la mortalità causata dalle malattie cardiovascolari e il consumo della β -Cn A¹ [Tailford *et al.*, 2003]. Il meccanismo d'azione ipotizzato si riferisce alla presenza di peptidi bioattivi, i quali sono prodotti nel latte con la variante A¹ e non con la variante A². Tali peptidi sembrano influenzare il sistema nervoso, endocrino

ed immunitario ed aumentare l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità [Bell *et al.*, 2008].

La scoperta del polimorfismo della κ -Cn risale al 1964. Mediante elettroforesi a pH alcalino, furono individuate due distinte bande o frazioni di κ -Cn, denominate A e B, la cui sintesi è controllata da geni autosomici codominanti [Mariani *et al.*, 1991] e successivamente le differenze riscontrate sono state identificate come mutazioni nel gene CNS3 [Strzalkowska *et al.*, 2002].

In seguito sono state individuate altre 9 varianti genetiche della κ -Cn: κ -Cn C ed E [Miranda *et al.*, 1993], κ -Cn F¹ [Sulimova *et al.*, 1992], κ -Cn F² e κ -Cn G [Prinzenberg *et al.*, 1996]. Quest'ultima variante è stata scoperta solo nelle razze Alpine ed è stata in seguito definita G¹, in quanto Sulimova *et al.* [1996] scoprirono un'altra variante della κ -Cn nello yak (*Bos grunniens*) che potrebbe essere denominata κ -Cn G². Infine sempre Prinzenberg *et al.* [1999] hanno determinato la κ -Cn H e la κ -Cn I e Mahé *et al.* [1999] hanno riportato la κ -Cn J nei bovini *Bos taurus*.

In particolar modo però, tra le 11 varianti genetiche della κ -Cn, quelle con una maggiore frequenza sono rappresentate dalle varianti A e B. Quest'ultima differisce dalla variante A per la sostituzione dell'aminoacidico isoleucina con la treonina in posizione 136 e dell'alanina con l'acido aspartico in posizione 148 [Mercier *et al.*, 1973; Strzalkowska *et al.*, 2002; Farrell *et al.*, 2004]. Quest'ultima sostituzione determina una differenza di carica netta, che conferisce alla variante A una maggiore mobilità elettroforetica in campo alcalino nei confronti della variante B.

Nell'ambito delle sieroproteine, la proteina più rilevante è rappresentata dalla β -Lg (LGB). Da quando Aschaffenburg e Drewry [1955] hanno riscontrato per la prima volta il polimorfismo della stessa, nuove varianti genetiche di quest'ultima sono state identificate fino ad oggi e in particolar modo dall'ultima revisione del 1984 [Eigel *et al.*, 1984] sono state identificate: β -Lg H [Conti *et al.*, 1988; Davoli *et al.*, 1988], β -Lg I e J [Godovac-Zimmermann *et al.*, 1996] e infine β -Lg W [Godovac-Zimmermann *et al.*, 1990].

Tra le 11 varianti genetiche della β -Lg, le varianti A e B risultano essere però le più frequenti e, in particolare, la variante B si differenzia dalla A per la sostituzione dell'aminoacido glicina con l'acido aspartico in posizione 64 e dell'alanina con la valina in posizione 118 [Strzalkowska *et al.*, 2002; Farrell *et al.*, 2004].

Infine l' α -La presenta due varianti genetiche predominanti rappresentate dalla variante A e B. Inoltre una terza variante (C) è stata riportata per quest'ultima sieroproteina, ma non è stata confermata con la sequenza proteica [Bell *et al.*, 1981].

3.3. L'INFLUENZA DEL POLIMORFISMO GENETICO SULLE CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE DEL LATTE.

Negli ultimi anni il polimorfismo genetico delle proteine del latte è stato oggetto di grande interesse all'interno del settore lattiero-caseario, dovuto in particolar modo, alla possibile relazione tra quest'ultimo e le caratteristiche di produzione, la composizione e le proprietà tecnologiche del latte.

Dagli studi effettuati infatti, è stato notato che le differenze tra le varianti genetiche delle singole proteine, anche se ridotte, possono influire sul comportamento della stessa proteina ed a livello del latte nei diversi processi tecnologici [Russo *et al.*, 1978].

È stato osservato che la variante A della α_{s1} -Cn differisce dalle altre varianti per la perdita di un gruppo di 13 aminoacidi, in posizione 14-26, in una regione a carattere prevalentemente idrofobico posta tra due zone idrofile e pertanto, presenta alcune proprietà fisiche che conferiscono al latte un diverso comportamento nel corso dei trattamenti termici e dei processi di trasformazione. La caratteristica che la contraddistingue è la solubilità in presenza di ioni calcio (CaCl_2) a concentrazioni superiori a 0,1 M ed a 1°C, mentre le varianti B e C precipitano nelle stesse condizioni. Inoltre la sua presenza conferisce alle micelle caseiniche un minor grado di solvatazione e determina una maggior eterogeneità nelle dimensioni delle micelle in relazione alla più elevata capacità di legare calcio e alla minore interazione, che in normali condizioni, manifesta nei riguardi della κ -Cn. Dal punto di vista caseario, in alcuni studi è stato notato che il latte con la variante A della α_{s1} -Cn presenta una velocità di acidificazione peggiore e un coagulo poco consistente e inadatto alla produzione casearia, che influenza di conseguenza la normale maturazione del formaggio, a differenza del latte con α_{s1} -Cn BC, per il quale sono state messe in evidenza migliori caratteristiche del coagulo [Russo *et al.*, 1978; Mariani *et al.*, 1999]. Tale comportamento sembra sia dovuto alla mancanza del

legame sensibile alla chimosina Phe²³-Phe²⁴ presente nel segmento della α_{s1} -Cn B o C ma non dell' α_{s1} -Cn A [Mariani *et al.*, 1999; Creamer *et al.*, 1997].

Nel caso della β -Cn, gli studi effettuati sulle varianti genetiche A e B di questa caseina hanno rilevato diversi comportamenti a livello della velocità di coagulazione. In particolar modo è stato verificato che la variante B è maggiormente idonea ai fini della produzione casearia [Russo *et al.*, 1978; Pecorari *et al.*, 1990]. Le micelle della β -Cn B, infatti, sono più stabili, ma anche molto più sensibili all'azione della chimosina rispetto a quelle che contengono β -Cn A, per cui esse tendono a coagulare in tempi più ridotti. Tale comportamento sembra esser dovuto ad una diversa dispersione micellare della caseina nativa, che vede nella β -Cn B una maggiore frequenza di micelle di piccolissima dimensione, quadro che potrebbero spiegare il diverso comportamento tecnologico, in quanto sembra legato alla maggior capacità con cui la variante B reagisce con il caglio, reattività determinata da una più ampia superficie di reazione della caseina nativa [Mariani *et al.*, 1999]. In altri studi inoltre è stato dimostrato che la β -Cn è il miglior emulsionante tra le caseine, in particolar modo la variante A¹ ha una elevata capacità emulsionante rispetto alla variante A² [Euston *et al.*, 1997].

Per quanto riguarda la κ -Cn, come è noto da diversi studi, la variante B è quella considerata più favorevole per il latte destinato alla trasformazione casearia, in quanto determina la presenza di micelle caseiniche più piccole e numerose, che coagulano più velocemente e formano un coagulo più consistente e con caratteristiche reologiche della massa caseosa (maggiore capacità di contrazione e di espulsione del siero) migliori a differenza della variante A, composta da micelle grandi e poco numerose [Losi *et al.*, 1973; Morini *et al.*, 1975; Morini *et al.*, 1983; Schaar *et al.*, 1985; Castagnetti *et al.*, 1986]. Pertanto il quadro micellare caseinico del latte con κ -Cn B risulta migliore rispetto a quello del latte con la variante A, in quanto è stato osservato che le micelle presentano una maggiore superficie complessiva e sono di dimensione più omogenea e ciò determina una coagulazione più rapida del latte [Macheboeuf *et al.*, 1993], la formazione di una cagliata più consistente e migliore in fase di caseificazione, in quanto i granuli caseosi sono più uniformi e presentano una maggiore sineresi, il cui grado di coesione porta alla formazione di masse caseose con migliori caratteristiche reologiche e una maggior resa in formaggio [Mariani *et al.*, 1976; Pecorari *et al.*, 1990]. La variante A, al contrario, sembra conferire

maggior stabilità alle micelle caseiniche disperse nel latte e di conseguenza il latte con tale variante è più adatto per la produzione di latte alimentare [Russo *et al.*, 1978].

Le caratteristiche attribuite alla variante B sono state confermate anche in altri studi più recenti [Mariani *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 1995; FitzGerald *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1999; Gastaldi *et al.*, 2003].

Tra le sieroproteine, la β -Lg presenta con maggior frequenza la variante A e la B, che risultano le più importanti dal punto di vista del settore lattiero caseario. Queste varianti sono rilevanti perché sono associate ad effetti quantitativi sulla composizione del latte e sulle sue proprietà tecnologiche, come ad esempio, la consistenza del coagulo [McLean *et al.*, 1984; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990; Van Eenennaam *et al.*, 1991; Ng-Kwai Hang *et al.*, 1992]. Nello specifico la variante B, come è noto, è correlata con elevati contenuti di caseina del latte e con l'indice di caseina, e quindi con una maggior resa in formaggio [Lundén *et al.*, 1997; Mariani *et al.*, 1999; Robitaille *et al.*, 2002], mentre la variante A è correlata a maggiori contenuti in sieroproteine [Mariani *et al.*, 1979b; Morini *et al.*, 1983; Jacob *et al.*, 1992; Hill, 1993] ed ad una alta capacità emulsionante [Euston *et al.*, 1997]. Inoltre le caratteristiche di idrolisi di quest'ultima sono differenti dalle varianti B e C [Creamer *et al.*, 2004].

Nel latte ad uso alimentare, come è noto, la componente proteica in seguito ai trattamenti termici, può essere soggetta a denaturazione, che interessa in "primis" ed in particolar modo, le proteine del siero [Nielson *et al.*, 1996; Manderson *et al.*, 1997]. In questo caso, dagli studi eseguiti, è emerso che la β -Lg A risulta più stabile al calore rispetto alla variante B, in quanto quest'ultima interagisce più velocemente della A con la κ -caseina nel formare il complesso β -lattoglobulina-caseina e, di conseguenza, il latte che la contiene è meno stabile al calore [FitzGerald *et al.*, 1997]. Pertanto la variante A è più idonea per la produzione di latte alimentare, il quale è sottoposto ai trattamenti di pastorizzazione e di sterilizzazione, con minore rischio che si verifichi l'inconveniente della formazione di precipitati.

3.4. L'INFLUENZA DELLE VARIANTI GENETICHE DELLE PROTEINE SULLE CARATTERISTICHE PRODUTTIVE DEL LATTE.

Numerose ricerche sono state realizzate per constatare se le varianti genetiche sono associate ad alcuni caratteri produttivi delle bovine zootecnicamente interessanti e, di conseguenza, possono essere impiegate per il miglioramento di quest'ultimi. Appare, pertanto, evidente l'importanza che ha assunto negli ultimi anni, lo studio delle relazioni tra le varianti genetiche delle proteine del latte e le caratteristiche produttive delle bovine, anche se in diversi studi le scoperte riscontrate sono state contraddittorie [Schaar *et al.*, 1985; Jacob *et al.*, 1992].

D'altronde in molti studi l'attenzione è stata focalizzata sull'effetto di un singolo *locus* delle proteine del latte, piuttosto che sull'effetto di fenotipi composti (aplotidi) sulla composizione e le proprietà tecnologiche del latte [Mayer *et al.*, 1997]. La combinazione degli alleli su un particolare cromosoma è chiamata aplotipo, la frequenza del quale può essere solo stimata attraverso l'esame delle frequenze osservate dalle combinazioni genotipiche. Infatti è stato dimostrato, attraverso modelli genetici nel campo della selezione, che esiste un effetto combinato tra i *loci*, il cosiddetto "linkage". Quest'ultimo naturalmente deve essere preso in considerazione quando si seleziona per un determinato genotipo, in modo tale da ottenere effetti altamente significativi nei riguardi della composizione e delle principali proprietà tecnologiche del latte, in quanto la selezione a favore di un allele comporta necessariamente anche la selezione per gli altri alleli ad esso associati [Ojala *et al.*, 1997]. Non bisogna, inoltre, dimenticare che oltre ai fattori genetici, altri fattori possono influenzare le caratteristiche produttive delle bovine, come il numero di lattazioni, lo stadio di lattazione e lo stato fisiologico, così come, le condizioni ambientali e il tipo di razionamento alimentare.

Mediante tecniche di mappatura genetica è stato confermato che i *loci* delle caseine (α_{s1} , β e κ) sono localizzati sul cromosoma 6, il gene della β -Lg sul cromosoma 11 e il gene della α -La sul cromosoma 5 [Bleck *et al.*, 1993; Ruottinen *et al.*, 2004].

Per quanto riguarda gli effetti delle varianti genetiche, il genotipo BB della α_{s1} -Cn sembra influenzare la produzione del latte, del grasso e delle proteine [Aleandri *et al.*, 1990], anche se secondo alcuni studi sono stati riscontrati alcuni effetti solo sulla percentuale delle

proteine [Bovenhuis *et al.*, 1992], mentre in altri non è stato riscontrato alcun effetto, ad eccezione del fenotipo BC associato con alti contenuti proteici rispetto al fenotipo BB [Ng-Kwai Hang *et al.*, 1997].

In alcune ricerche il genotipo della β -Cn non sembra esser associato ai caratteri produttivi [Aleandri *et al.*, 1990], mentre in altri studi gli effetti del genotipo di questa caseina sono risultati significativi sulla produzione di latte, la percentuale di grasso e il contenuto proteico [Bovenhuis *et al.*, 1992]. In particolare, la variante A² nel latte delle bovine di razza Frisona sembra esser associata ad una maggior produzione di latte, grasso e proteine rispetto alla variante A¹, mentre un effetto opposto è stato riscontrato nel latte delle bovine di razza Jersey [Winkelman *et al.*, 1997]. In altri studi, invece, nel latte con la variante A² è stata riscontrata una minor concentrazione di proteine totali e di caseina [Ng-Kwai Hang *et al.*, 1997]. Per quanto riguarda la variante B, quest'ultima sembra influire positivamente sulla sintesi della caseina, mentre non sembra in grado di esercitare effetti importanti nei riguardi delle sieroproteine [Pecorari *et al.*, 1990].

Gli studi effettuati, inoltre, hanno dimostrato l'influenza del genotipo della κ -Cn sulla produzione di latte, grasso, proteine, che risultano maggiori nel latte con la variante B rispetto alla variante A [Strzalkowska *et al.*, 2002]. In particolare κ -Cn B è associata con un alto contenuto di proteine, caseina e una maggior produzione di latte [Aleandri *et al.*, 1990; Bovenhuis *et al.*, 1992; FitzGerald *et al.*, 1997]. Il contenuto di caseina nel latte è, come già sottolineato in precedenza, fondamentale per la determinazione di alcune caratteristiche del coagulo, con particolare riferimento alla sua consistenza, in quanto il latte con un determinato contenuto di caseina, dà origine ad una cagliata reologicamente più equilibrata, omogenea e sufficientemente elastica, dotata di una buona capacità di contrazione, condizione basilare per ottenere un formaggio uniformemente disidratato [Pecorari *et al.*, 1990].

Alcune differenze sono state riportate anche per il contenuto di acido citrico nel latte, il quale è stato dimostrato essere inferiore del 10% circa nel latte con la variante B rispetto alla variante A [Mariani *et al.*, 1979a; Schaar *et al.*, 1985].

Per quanto riguarda i genotipi della β -Lg, il genotipo omozigote AA sembra contenere una concentrazione inferiore del 7% di caseina totale, 11% di grasso e 6% di solidi totali e nello stesso tempo, una maggior concentrazione del 30% di sieroproteine (β -Lg) e di proteine totali rispetto al genotipo BB [Hill, 1993]. Quest'ultimo a sua volta, risulta esser associato

ad un maggior contenuto di caseina e di grasso, ad un elevato indice caseinico ed ad una maggior produzione di formaggio e contemporaneamente, ad una minor produzione di latte e di proteine [Aleandri *et al.*, 1990; Pecorari *et al.*, 1990; Bovenhuis *et al.*, 1992]. Tali risultati non sono stati confermati in altri studi, nei quali appunto, non è stata riscontrata alcuna influenza del genotipo della β -Lg sulla produzione e composizione del latte, ad eccezione per un elevato contenuto proteico nel latte delle bovine con la variante A [Strzalkowska *et al.*, 2002]. Nel settore lattiero-caseario ed in particolare nella produzione dello yogurt, inoltre, è stato dimostrato che la sineresi è maggior con β -Lg A rispetto a β -Lg B, pertanto quest'ultima sembra più idonea per essere impiegata in quest'ultimo settore [FitzGerald *et al.*, 1997].

Infine per l' α -La A è stata riscontrata una maggior produzione di latte ed una minor percentuale di grasso e di proteine, mentre al contrario, la variante B è stata associata ad una minor produzione di latte e ad una maggior percentuale di grasso e di proteine [Bleck *et al.*, 1993].

CAPITOLO 4

4.1. LA FRAZIONE LIPIDICA DEL LATTE BOVINO

I lipidi (dal greco “*lipos*” = “grasso”) sono sostanze caratterizzate da insolubilità in acqua e solubilità in solventi organici non polari. Hanno diverse funzioni in natura, prima fra tutte, sono una importante fonte energetica, in quanto il loro apporto calorico è di 9 kcal/g, che viene trasformato in energia termica per mantenere costante la temperatura corporea, in energia meccanica per permettere la contrazione muscolare ed in energia chimica per consentire lo svolgimento delle funzioni biochimiche corporee.

I lipidi, pertanto, sono molto diffusi sia nel mondo animale che vegetale, in quanto rappresentano i componenti a più alta concentrazione energetica. Quelli più complessi svolgono funzioni biologiche delicate ed importanti, come precursori di molti ormoni ed inoltre, sono presenti in maggiori concentrazioni nei tessuti od organi complessi, come quelli riproduttivi, cerebrali, epatici, etc.

Considerando la frazione lipidica del latte bovino, quest’ultima presenta una percentuale di grasso che varia dal 3,5 al 4%, con ampie oscillazioni individuali e stagionali e si ritrova nel latte come emulsione sottoforma di globuli sferici, la cui sintesi avviene a livello delle cellule secrettrici dell’epitelio della ghiandola mammaria [McPherson *et al.*, 1983; Walstra *et al.*, 1984; Danthine *et al.*, 2000; Secchiari *et al.*, 2002]. Nelle altre specie lattifere la percentuale può raggiungere anche punte dell’8% (latte ovino di alcune razze).

È la componente più variabile in funzione dello stadio di lattazione, dell’alimentazione, della razza, delle caratteristiche lattifere individuali e delle condizioni ambientali. La sostanza grassa è sintetizzata in parte nella ghiandola mammaria a partire da acidi grassi volatili sintetizzati nel rumine dei ruminanti (da C_{4:0} a C_{16:0}), in parte da acidi grassi provenienti dalla dieta (C_{18:0} >).

Tale componente è mediamente rappresentato da:

- trigliceridi 98% (lipidi neutri)
- fosfolipidi 1% (lipidi complessi o polari)
- sostanze insaponificabili < 1%

Chimicamente i trigliceridi derivano dall'esterificazione degli acidi grassi con un alcol trivalente, la glicerina. Pertanto a seconda del numero dei legami esterificati, i grassi si distinguono in trigliceridi (3 legami esterificati), digliceridi (2 legami esterificati) e monogliceridi (1 legame esterificato). Gli ultimi due sono presenti nel latte assieme ai trigliceridi rispettivamente intorno a 1,5 e 0,25% dei lipidi totali.

Per quanto riguarda la composizione in acidi grassi, il grasso del latte è uno dei componenti più complessi, essendo costituito da 150 acidi grassi diversi, presenta una proporzione pari a circa 2/3 di acidi grassi saturi ed 1/3 di acidi grassi insaturi ed una specifica proporzione elevata di acidi grassi volatili a basso peso molecolare.

Nel grasso del latte sono presenti principalmente gli acidi grassi a numero pari di atomi di carbonio compresi tra il C_{4:0} e il C_{20:0}, mentre quelli a numero dispari sono presenti solo in tracce. Quasi tutti gli acidi grassi saturi hanno un numero pari di atomi di carbonio, dal momento che il punto di partenza della loro sintesi è l'acido acetico (C_{2:0}) (Tab. 11). Inoltre quelli compresi tra C_{4:0} e C_{10:0} e una parte del C_{12:0} sono volatili, se presenti allo stato libero, cioè non esterificati con la glicerina e sono molto importanti, in quanto influenzano le caratteristiche organolettiche del latte e la qualità dei prodotti caseari, così come ad esempio sono responsabili della formazione dell'aroma [Poveda *et al.*, 1999]. Soprattutto i primi due acidi volatili (butirrico e caproico) costituiscono la parte più caratteristica del latte dei ruminanti, sono solubili in acqua e rappresentano circa il 5% dell'insieme. Naturalmente nei non ruminanti, in cui l'utilizzazione dell'acido acetico nella mammella è molto meno intensa, la presenza di questi acidi volatili è inferiore.

Tabella 11. Principali acidi grassi del grasso di latte bovino

Categoria	N° di di C	atomi % sul totale	Stato fisico (temperatura di fusione, °C)
Acidi grassi saturi $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ 67%			
Volatili solubili:			
Butirrico	C _{4:0}	3- 4 (tr.) *	Liquido (- 8)^
Caproico	C _{6:0}	2-5 (tr.)	Liquido (- 3)
Volatili insolubili:			
Caprilico	C _{8:0}	1 – 1,5 (tr.)	Liqu. Solido (+ 16)
Caprico	C _{10:0}	2 (2)	Solido (+ 30)
Laurico	C _{12:0}	3 (8)	Solido (+ 42)
Fissi:			
Miristico	C _{14:0}	11 (10)	Solido (+ 54)
Palmitico	C _{16:0}	25 – 30 (23)	Solido (+ 62)
Stearico	C _{18:0}	12 (7)	Solido (+ 70)
Arachico	C _{20:0}	0,2	Solido (+ 75)
Acidi insaturi 33 %			
Monoeni:			
Palmitoleico	C _{16:1}	2 (5)	Liquido (+ 0,5)
Oleico (<i>cis</i> 9)	C _{18:1}	23 (35)	Liq. Solido (+ 16)
Vaccenico (<i>trans</i> 11)	C _{18:1}	2 – 3	Solido (+ 43)
Polinsaturi non coniugati:			
(dieni) Linoleico	C _{18:2}	2 (8,5)	Liquido
(trieni) Linolenico	C _{18:3}	0,5 (2)	Liquido
(tetraeni) Arachidonico	C _{20:4}	0,2	Liquido
Polinsaturi coniugati:			
Dieni	C _{18:2}	0,8	Liquido
Trieni e tetraeni	C _{18:3} -C _{18:4}	tracce	Liquido

(*) Tra parentesi alcune percentuali relative al latte umano

(^) Il punto di fusione dei trigliceridi è vicino a quello dell'acido grasso, nel caso degli acidi fissi.

Da: Salvadori del Prato, 1998.

Fra gli acidi grassi saturi, determinati mediante tecniche cromatografiche (GC, GC-MS, HPLC), il componente principale è l'acido palmitico (dal 25 al 30% sul totale degli acidi grassi), seguito dalle concentrazioni intermedie dell'acido stearico e miristico (~12% e 11% rispettivamente), mentre fra gli acidi grassi insaturi, quello presente in maggiori concentrazioni è l'acido oleico (~23%) [Malacarne *et al.*, 2001]. Inoltre, sono presenti piccole quantità di acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi, dienici e trienici, ed in particolare, questi ultimi rientrano nel gruppo degli acidi grassi considerati essenziali per l'alimentazione umana.

Una componente importante della frazione lipidica è rappresentata dai fosfolipidi, che si distinguono dai trigliceridi, in quanto sono lipidi polari che si ritrovano maggiormente legati alla membrana del globulo di grasso (circa il 60% dei fosfolipidi totali del latte) e presentano una parte lipofila, costituita da acidi grassi per lo più insaturi, esterificati ad una molecola di glicerolo, e una parte idrofila costituita da una molecola di acido fosforico legata ad una base azotata [Caboni *et al.*, 1983]. Tra i principali fosfolipidi del latte troviamo la lecitina, che ha come base organica la colina, le cefaline, che contengono etanolammina e le sfingomieline, con basi sfingosina e colina. Le lecitine sono eccellenti agenti emulsionanti e giocano un ruolo importante nella costituzione delle membrane dei globuli di grasso del latte, contribuendo a rendere stabile la sospensione della sostanza grassa.

Il grasso del latte è costituito, in concentrazioni modeste (0,5 % del totale degli acidi grassi), anche da cheto e ossiacidi e da lattoni derivanti dagli ossiacidi. Questi composti sono parzialmente responsabili dell'aroma del latte e dei prodotti lattiero-caseari e la loro concentrazione aumenta con il riscaldamento.

La quota insaponificabile del grasso del latte è costituita da steroli, carotenoidi e vitamine liposolubili. Il più abbondante è il colesterolo (~0,3% del grasso, cioè 0,1 g/L di latte), che riveste una grande importanza nutrizionale come precursore di molti ormoni e della vitamina D. Esso agisce da emulsionante e stabilizzatore del grasso, mantenendo l'integrità

funzionale delle membrane cellulari, di cui regola la fluidità e la permeabilità, ed ha un effetto parzialmente inibitore sulle lipasi. Gli steroli del latte, inoltre, sembrano strettamente associati alla lecitina, di cui regolano il potere idrofilo.

I carotenoidi sono i coloranti naturali del latte e dei latticini e il loro contenuto varia con l'alimentazione degli animali e quindi con l'andamento stagionale. Nel latte si trovano principalmente i caroteni isomeri α e β , la vitamina A ed una bassa concentrazione di xantofilla, di squalene e di licopene. I caroteni, come i grassi, sono protetti dall'ossidazione dei tocoferoli (vit. E), che a loro volta, svolgono la funzione di antiossidanti, ed in particolare, nel latte bovino il loro tenore è molto variabile (da 0,2 a 1,2 mg/L).

4.2. CLASSIFICAZIONE E NOMENCLATURA DEGLI ACIDI GRASSI

La composizione in acidi grassi del latte è caratterizzata da acidi grassi saturi ed insaturi a seconda del numero dei doppi legami presenti nella catena molecolare.

La definizione di un acido grasso, pertanto, è basata sul numero di atomi di carbonio (C), sul numero di doppi legami che determinano il grado di insaturazione e sulla posizione di quest'ultimi sulla catena molecolare.

Gli acidi grassi possono essere classificati in vari modi anche se la classificazione in base alla lunghezza ed al grado di insaturazione sembra essere la più utile per schematizzare la relativa funzione biologica [Gabaldo *et al.*, 2007]:

- Saturi: non contengono alcun doppio legame, rappresentano quantitativamente la maggior parte degli acidi grassi presenti in natura e sono normalmente allo stato solido a temperatura ambiente;
- Insaturi: sono caratterizzati da uno o più doppi legami, sono presenti in minor quantità rispetto a quelli saturi e sono liquidi a temperatura ambiente. Essi si dividono in :
 - a) Acidi grassi monoinsaturi con un solo doppio legame;

b) Acidi grassi polinsaturi con più doppi legami tra gli atomi di carbonio.

Per la nomenclatura di tali acidi si utilizza il sistema ω (indicato anche con il termine “n”), nel quale è considerata la posizione del primo doppio legame più lontano dal metile (CH_3) presente nella molecola dell’acido grasso in posizione 1 [O’Keefe, 1998]. L’acido oleico, ad esempio, è un $\text{C}_{18:1}$ con un doppio legame ed appartiene alla serie ω 9, perché il doppio legame più lontano dal metile è situato a livello del nono carbonio.

Un altro metodo utilizzato per la nomenclatura degli acidi grassi insaturi, si avvale del simbolo Δ (delta), per indicare la posizione dei doppi legami partendo dal gruppo carbossilico (COOH).

Il sistema omega (ω o n) viene utilizzato quando si esaminano gli acidi grassi con riferimento alla nutrizione, mentre il sistema Δ è adottato in particolar modo per osservare le reazioni chimiche degli acidi grassi. Gli enzimi desaturasi per esempio, si riferiscono a quest’ultimo sistema, perché la loro azione catalitica è conforme con l’inserzione stereospecifica di un doppio legame dal carbossile terminale degli acidi grassi.

Per quanto riguarda gli acidi grassi coniugati, quest’ultimi si distinguono dagli altri per avere un legame semplice tra due legami doppi (es. isomeri dell’acido linoleico coniugato = CLA) (fig. 8).

Un’altra differenza da ricordare, è la possibilità di avere forme isometriche, sia di posizione nella catena, che di posizione intorno al doppio legame, cioè di avere l’isomeria geometrica in forma *cis* o *trans* [Secchiari *et al.*, 2002]. Queste due configurazioni si differenziano a seconda della disposizione spaziale attorno al doppio legame. Se i gruppi della catena si dispongono dalla stessa parte del doppio legame, la configurazione è *cis*, se si verifica il contrario la configurazione è *trans* (Fig. 8).

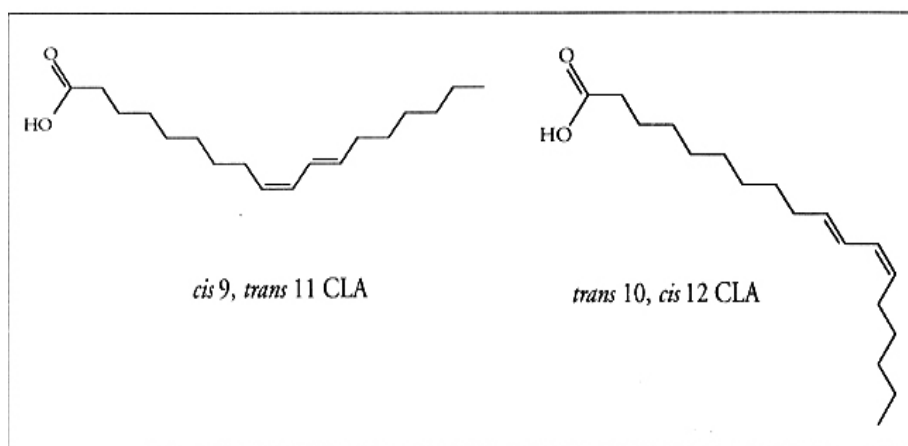


Figura 8. Isomeri del CLA più comuni nei prodotti di origine animale.

Da: Secchiari *et al.*, 2002.

4.3. SINTESI DEGLI ACIDI GRASSI

Le cellule secernenti della ghiandola mammaria sintetizzano i lipidi del latte partendo dagli acidi grassi che, per il 40% viene sintetizzato *de novo* nelle cellule stesse, a partire dall'acetato e dal β -idrossibutirrato (che contribuisce per il 15%) e per il rimanente 60% è costituito da acidi grassi prelevati dal flusso ematico [Secchiari *et al.*, 2002].

Come è noto, infatti, la popolazione microbica del rumine è responsabile della degradazione e della fermentazione dei carboidrati e delle proteine presenti nella dieta e, di conseguenza, della produzione di acidi grassi volatili (AGV) quali l'acido acetico, propionico e butirrico, indicati normalmente come acetato, propionato e butirrato. In particolare, l'acetato e il butirrato (preventivamente convertito in 3-idrossibutirrato a livello delle pareti ruminali) sono i precursori degli acidi grassi a media e corta catena del latte e del tessuto adiposo [Chilliard *et al.*, 2000] e il loro equilibrio dipende anche dalla composizione della dieta ed in particolar modo, dalla proporzione della fibra nella razione alimentare. Al contrario, la produzione del propionato dipende dalla proporzione dei concentrati inseriti nella razione alimentare.

Nei ruminanti, al contrario dei monogastrici, è il tessuto adiposo e non il fegato, il cui metabolismo è orientato verso la sintesi del glucosio, il sito maggiormente attivo per la

sintesi degli acidi grassi, mentre per gli animali in lattazione è rappresentato dalla ghiandola mammaria.

In particolare, la sintesi degli acidi grassi saturi fino a 16 atomi di carbonio avviene nel citoplasma mediante il coinvolgimento di due enzimi: l'acetil-CoA-carbossilasi (ACC) e la sintasi acidi grassi (FAS) [Chilliard *et al.*, 2000]. Nella ghiandola mammaria, pertanto, l'allungamento della catena può proseguire fino alla formazione di acidi grassi con 14 o 16 atomi di carbonio, ma quest'ultimo non può essere convertito ad acido stearico ($C_{18:0}$), sebbene una piccola proporzione di $C_{14:0}$ e $C_{16:0}$ è desaturato a $C_{14:1}$ e $C_{16:1}$.

Pertanto gli acidi grassi preformati a media e a lunga catena (con 16 o più atomi di carbonio) presenti nel plasma sanguigno e provenienti dalla dieta o dalla mobilizzazione delle riserve corporee, possono essere utilizzati dai tessuti, grazie all'azione dell'enzima lipoproteinlipasi (LPL), mediante il prelievo diretto dal circolo ematico degli acidi grassi non esterificati (NEFA) o da quelli contenuti nei chilomicroni e nelle lipoproteine molto bassa densità (VLDL). Inoltre, le cellule della ghiandola mammaria mediante l'enzima Stearoil-CoA-desaturasi (SDC), che è in grado di introdurre un doppio legame in posizione $\Delta 9$, consentono di convertire l'acido stearico in acido oleico.

Pertanto, gli acidi grassi così formati possono essere utilizzati nella ghiandola mammaria e nel tessuto adiposo per la sintesi dei trigliceridi e dei fosfolipidi.

Gli acidi grassi a lunga catena sono potenti inibitori della sintesi degli acidi grassi di sintesi mammaria, attraverso un diretto effetto inibitorio sull'attività dell'acetil-CoA-carbossilasi (ACC). Un terzo fattore che potrebbe provocare questo cambiamento è anche la ridotta disponibilità di acetato e di 3-idrossibutirrato per la sintesi mammaria.

4.4. METABOLISMO LIPIDICO RUMINALE

Alcuni studi sul metabolismo lipidico ruminale si sono concentrati principalmente sul destino degli acidi grassi, ed in particolare, su come essi attraversino il rumine e siano così soggetti all'azione della popolazione microbica [Jenkins, 1993; Doreau *et al.*, 1994]. Da tali studi, sono state evidenziate due importanti trasformazioni microbiche nel rumine: la lipolisi e la bioidrogenazione.

La lipolisi comporta il rilascio degli acidi grassi liberi consentendo così la successiva bioidrogenazione, che consiste nella riduzione del numero dei doppi legami presenti sulla catena carboniosa.

La presenza microbica comporta una sintesi di acidi grassi “*de novo*” dai precursori dei carboidrati, pertanto i lipidi che raggiungono il duodeno sono composti da acidi grassi la cui origine può essere sia alimentare che microbica.

Lo studio del metabolismo lipidico ruminale nella bovina da latte riveste particolare importanza per due motivi [Buccioni *et al.*, 2002]:

1. poter controllare gli effetti antimicrobici degli acidi grassi, al fine di consentire l'integrazione della razione con fonti lipidiche, senza andare incontro ai disturbi delle fermentazioni ruminali e dei processi digestivi;
2. poter regolare la bioidrogenazione al fine di regolare l'assorbimento di specifici acidi grassi che possono esaltare le performances produttive degli animali o migliorare la qualità nutrizionale del latte.

Per quanto riguarda la sintesi degli acidi grassi di origine microbica, il contenuto lipidico totale della sostanza secca batterica nel rumine varia da un 10 ad un 15%. Questa variazione è possibile dal momento che i lipidi di origine batterica provengono sia da fonti esogene (aumento di acidi grassi a lunga catena nella dieta) che da fonti endogene (sintesi “*de novo*”), ed il loro contributo dipende dal contenuto lipidico della dieta e dalle specie batteriche specifiche.

Gli acidi grassi monoinsaturi invece rappresentano il 15-20% degli acidi grassi batterici e sono sintetizzati per via anaerobica, mentre gli acidi grassi polinsaturi non sono comunemente sintetizzati dai batteri, ad eccezione per i cianobatteri. Pertanto, gli acidi grassi presenti nei microbi ruminali sono probabilmente il risultato di un aumento esogeno di acidi grassi preformati.

Molto importante da ricordare è che, i lipidi aggiunti nelle diete dei ruminanti possono interferire con le fermentazioni nel rumine, causando una ridotta digeribilità delle fonti energetiche non lipidiche. La digestione ruminale dei carboidrati strutturali, per esempio, può essere ridotta del 50% più o meno con il 10% del grasso aggiunto. Questa riduzione è accompagnata da una bassa produzione di metano, idrogeno e acidi grassi volatili,

compreso un più ridotto rapporto di acetato/propionato. Quando i supplementi lipidici inibiscono la fermentazione ruminale, limitando la fermentazione nell'ultima parte dell'intestino, potrebbero anche diminuire la digeribilità della fibra nell'intero tratto digestivo. Ciò non avviene invece con il grasso della dieta, il quale risulta meno nocivo per la digeribilità dei carboidrati non strutturali. È stato anche osservato che, l'aumento del livello del grasso nella dieta dei ruminanti comporta un incremento degli acidi grassi a lunga catena e contemporaneamente una riduzione di quelli a corta e a media catena [Carroll *et al.*, 2006].

Anche il metabolismo delle proteine nel rumine viene alterato quando i supplementi in grasso interferiscono con la fermentazione. Infatti è stato dimostrato che negli ovini integrando alla razione olio di semi di lino, si riduce la digestione della frazione proteica nel rumine, seguita da una diminuzione della concentrazione di ammoniaca e da un incremento del contenuto di azoto nel flusso duodenale. Questi cambiamenti sono spesso accompagnati da un aumento dell'efficienza della sintesi proteica microbica nel rumine. Tale efficienza è stata attribuita alla riduzione del numero dei protozoi nel rumine e al minor contenuto di azoto batterico o all'aumento della dose diluita di solidi nel rumine come conseguenza del grasso aggiunto.

Analizzando le proprietà interferenti dei lipidi sulle fermentazioni, alcuni studi hanno chiarito che gli effetti variabili delle fonti di grasso di solito si possono attribuire a poche differenze di base, che riguardano in particolare la struttura lipidica. Un fattore da considerare ad esempio è il livello di insaturazione, dal momento che soprattutto gli acidi grassi insaturi inibiscono maggiormente le fermentazioni rispetto agli acidi grassi saturi. Anche un gruppo carbossile libero è importante per l'inibizione delle fermentazioni a causa degli acidi grassi derivati, come i sali di calcio degli acidi grassi a lunga catena, alcoli grassi, acil amidi grassi e trigliceridi, che d'altronde inibiscono la fermentazione in minor misura rispetto agli acidi grassi liberi. Per questo motivo, oggi esistono dei grassi ruminalmente inerti come i sali di calcio degli acidi grassi a lunga catena, i grassi arricchiti in acidi grassi saturi e i grassi protetti mediante incapsulazione.

I maggiori cambiamenti che si verificano nella concentrazione ruminale riguardano principalmente gli acidi grassi liberi insaturi (Fig. 9), in quanto quest'ultimi probabilmente determinano degli effetti negativi maggiori sulla capacità fermentativa rispetto alle altre frazioni lipidiche (acidi grassi liberi saturi e trigliceridi).

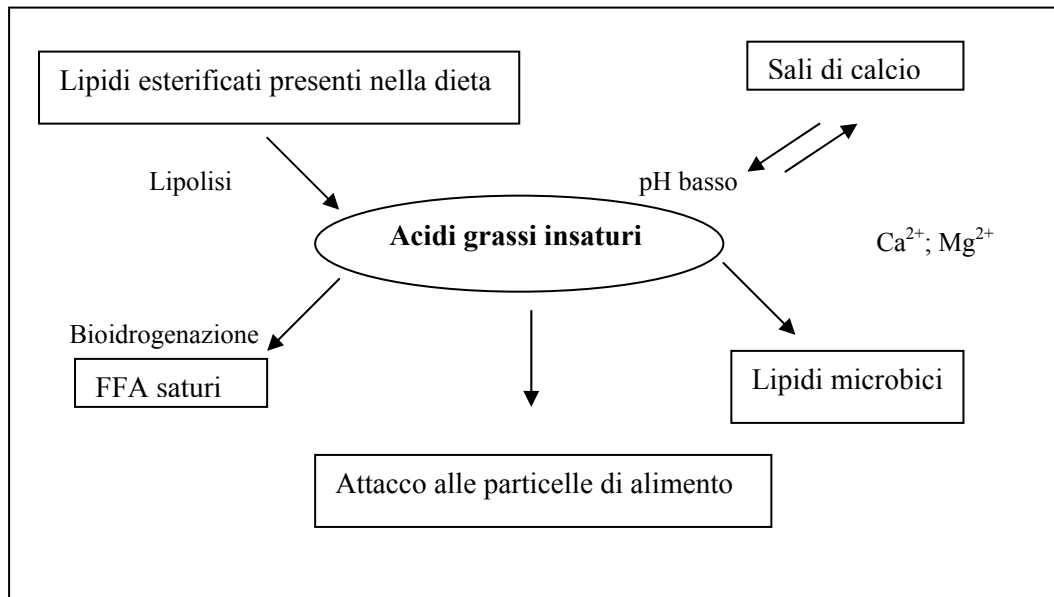


Figura 9. Modificazioni ruminali degli acidi grassi insaturi.

Da: Buccioni *et al.*, 2002.

La concentrazione degli acidi grassi insaturi nel rumine è regolata dal contenuto e dal tipo di grasso aggiunto e anche dal tasso di lipolisi, bioidrogenazione e formazione di sali carbossilati. Alte concentrazioni di trigliceridi nella dieta aumentano il contenuto dei lipidi totali nel rumine, ma il corrispondente aumento nel pool ruminale di acidi grassi liberi insaturi potrebbe essere più ridotto se la lipolisi e la bioidrogenazione fossero diminuite o se la formazione di sali carbossilati fosse alta. I livelli di lipolisi di solito sono sufficienti per convertire la maggior parte dei trigliceridi nella dieta in acidi grassi liberi. Alcuni studi hanno rivelato, inoltre, che i livelli di lipolisi e bioidrogenazione sono alterati sostanzialmente dall'inclusione di foraggi ad elevato stadio di maturità, dal basso contenuto di azoto e dalla taglia (alimenti finemente macinati) delle particelle alimentari nel rumine [Buccioni *et al.*, 2002]. In quest'ultimo caso, le dimensioni delle particelle alimentari rivestono una importanza fondamentale, in quanto influenzano l'aderenza dei batteri sulla loro superficie ed aumentano la velocità di transito attraverso la barriera ruminale, diminuendo il tempo di esposizione all'attività batterica.

Pertanto, anche la composizione della dieta di base potrebbe influenzare, come una fonte di grasso, le fermentazioni ruminali. Infatti i grassi che normalmente inibiscono la

fermentazione e la digestione, possono ridurre tale capacità quando il contenuto di fieno nella razione è elevato.

Se consideriamo, in particolare, la regolazione del flusso duodenale degli acidi grassi insaturi, possiamo sottolineare che il rumine rappresenta una barriera formidabile per la distribuzione degli acidi grassi insaturi nel piccolo intestino. Infatti l'idrogenazione degli insaturi presenti nella dieta da parte dei microbi ruminali, arricchisce il chimo duodenale di acidi grassi saturi, i quali vengono assorbiti e depositati nei vari tessuti del corpo. Inoltre è stato dimostrato che l'aggiunta di lipidi nella dieta dei ruminanti, comporta solo un aumento passeggero dei polinsaturi nell'abomaso e pertanto si ha un aumento limitato del flusso di acidi grassi polinsaturi nel duodeno.

Alcuni studiosi inoltre, hanno verificato che miscelando del grasso aggiunto di origine animale e vegetale (59% acidi grassi insaturi) nella dieta giornaliera di alcuni bovini, aumenta la quantità di acido linoleico da 171 a 296 g/d, ma nel flusso duodenale aumenta solo da 45 a 54 g/d. Tuttavia gli studi effettuati, hanno chiarito che alcuni acidi grassi insaturi della dieta riescono a sottrarsi alla bioidrogenazione e quando sono aggiunti elevati contenuti di polinsaturi non protetti, l'assorbimento di questi aumenta solo lievemente. Il grado di acidi grassi insaturi che riescono a sfuggire all'idrogenazione dipende, soprattutto, dalle condizioni di crescita microbica, che influenza i livelli di lipolisi e bioidrogenazione. Le granaglie per esempio, diminuiscono la bioidrogenazione ruminale e promuovono l'aumento degli insaturi nel grasso della carcassa degli animali e nel latte. Questo effetto è attribuito alla diminuzione della lipolisi come conseguenza di un basso pH ruminale. Comunque, la completa idrogenazione degli insaturi ad acido stearico diminuisce sia quando aumenta la concentrazione degli acidi grassi insaturi aggiunti, sia quando i trigliceridi vengono sostituiti dagli acidi liberi.

Per permettere, quindi, un passaggio elevato di acidi grassi insaturi dal duodeno, sin dal 1970, sono stati effettuati diversi tentativi per proteggere quest'ultimi dalla bioidrogenazione, e il primo approccio è stato l'incapsulazione dei lipidi in una matrice di proteine trattate con formaldeide [Ashes *et al.*, 1979]. Questa tecnologia ha infatti dimostrato l'aumento dell'assorbimento degli acidi grassi insaturi nei ruminanti e, di conseguenza, un aumento di insaturazione nella carne e nel latte. Tutto ciò ha portato, comunque, a considerare che gli acidi grassi protetti sono necessari in quanto effettivamente resistono alla bioidrogenazione, senza interferire con le fermentazioni

ruminali o con l'assorbimento lipidico intestinale. Tra le altre tecniche studiate, l'impiego dei sali di calcio degli acidi grassi, oggi è la tecnica più riconosciuta [Ferlay *et al.*, 1993; Chilliard *et al.*, 2000], seguita dall'impiego di semi integrali opportunamente trattati (estrusione, tostatura, etc.), il tegumento e le pareti cellulari dei quali rappresentano una sufficiente protezione nei riguardi dei lipidi contenuti [Antongiovanni *et al.*, 2002].

4.5. IL GLOBULO DI GRASSO

Il grasso nel latte si presenta come un'emulsione sottoforma di globuli di diametro variabile a seconda della specie da 0,1 a 15 μm (es. nel latte caprino, i globuli sono più piccoli rispetto quelli del latte bovino [Urbiené *et al.*, 1997]), con un diametro medio di 3-4 μm . L'80% dei globuli di grasso ha un diametro inferiore a 1 μm , il rimanente 20 %, che rappresenta in peso la quasi totalità del grasso, fra i 2 e i 6 μm . I globuli variano per dimensione e ciò naturalmente influenza le proprietà chimico-fisiche e sensoriali del latte e dei prodotti lattiero-caseari, mentre meno variabile è il numero di globuli per unità di volume, il che ha come conseguenza che nei latti ricchi di grasso i globuli tendono a presentare dimensioni più grandi [Corradini, 1995; Salvadori del Prato, 2005].

I globuli di grasso sono protetti da una membrana, non hanno una struttura omogenea, ma lamellare concentrica, dovuta alla sovrapposizione di strati di trigliceridi. In particolare, quelli altofondenti si dispongono esternamente nel globulo, quelli bassofondenti internamente e tale stratificazione si verifica nel corso della cristallizzazione frazionata del grasso durante il raffreddamento.

I gliceridi che costituiscono la parte interna del globulo sono rappresentati in massima parte da trigliceridi. Quest'ultimi sono delle molecole che hanno la capacità di cristallizzare in diverse forme polimorfiche e quelle principali sono α , β' e β nell'ordine di aumento di stabilità e punto di fusione.

La cristallizzazione dei trigliceridi è un processo lento che vede il grasso del latte inizialmente liquido a temperatura corporea, mentre in un secondo momento, cristallizza a temperature di raffreddamento, come avviene nel corso dei processi tecnologici. Tale comportamento termico, legato alla struttura cristallina di trigliceridi ad una determinata

temperatura, è di notevole importanza per quanto riguarda le proprietà sensoriali, tecnologiche e funzionali dei globuli di grasso del latte [Michalski *et al.*, 2004]. Nelle emulsioni, ad esempio nelle creme, si deve formare almeno un nucleo in ogni globulo per raggiungere la piena cristallizzazione e il tempo necessario per ottenere tale nucleo è inversamente proporzionale al volume del globulo. Di conseguenza, un maggior raffreddamento è necessario per indurre la cristallizzazione in un sistema disperso con globuli di grasso più piccoli.

All'interno delle cellule secernitrici dell'epitelio della ghiandola mammaria (adipociti), i piccoli globuli di grasso originano dal reticolo endoplasmatico e sono rilasciati dallo stesso, nel citosol protetti da uno strato di proteine e lipidi polari. Ancora oggi comunque, è sconosciuto se esiste una regione selettiva o specifica per il sito di origine dei globuli all'interno del reticolo endoplasmatico, se esistono fattori che inducono l'aumento dei triacilgliceroli nei globuli e se tale processo di formazione del globulo sia in qualche modo regolato.

Questi piccoli globuli (microlipidi), pertanto, si fondono tra di loro dando origine a globuli più grandi, denominati globuli di grasso citoplasmatici, mediante l'intervento del calcio e dei gangliosidi, che sembrano coinvolti, in qualche modo, nel processo di fusione [Heid *et al.*, 2005]. Pertanto i globuli di grasso transitano dal luogo di origine verso la regione apicale della cellula, ma il processo di migrazione non è ancora conosciuto con certezza. Una volta raggiunta la zona apicale i globuli si dissociano dalla cellula, circondati dalla membrana plasmatica (doppio strato), mediante esocitosi (Fig. 10). Questo processo è stato descritto per la prima volta nel 1959 [Heid *et al.*, 2005], ma altri studiosi hanno descritto anche un meccanismo alternativo basato su un'associazione tra i globuli di grasso e le vescicole secretorie nella regione apicale della cellula, che permettono l'esocitosi del

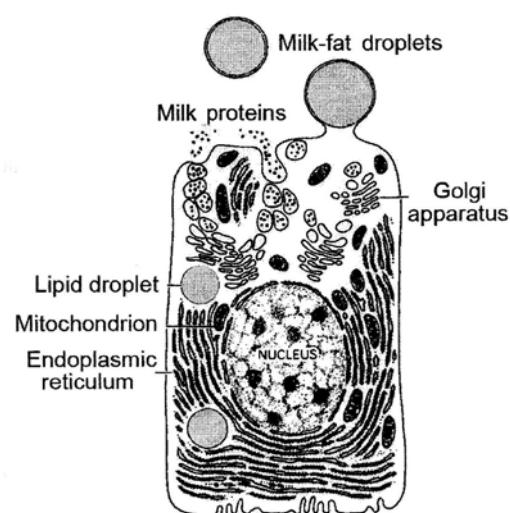


Figura 10. Tipica cellula in lattazione.

Da: Qi P., 2007.

globulo mediante vacuoli citoplasmatici. Inoltre, del materiale citoplasmatico può essere intrappolato tra il rivestimento interno e lo strato esterno della doppia membrana e tale risultato è conosciuto come “rigonfiamento citoplasmatico” [Dewettinck *et al.*, 2008].

Negli ultimi anni inoltre, la diversa dimensione dei globuli di grasso è stata oggetto di diversi studi, in quanto è noto che, le differenze legate a quest’ultimo aspetto hanno un notevole interesse sia a livello delle proprietà nutrizionali sia a livello delle caratteristiche tecnologiche e sensoriali per la produzione dei prodotti lattiero-caseari [Michalski *et al.*, 2003; Fauquant *et al.*, 2005].

Nel 1998, Goudedranche *et al.*, [Michalski *et al.*, 2004] hanno studiato un processo di microfiltrazione in grado di separare dal latte i globuli di grasso di diverso diametro, in quanto altri Autori [Walstra, 1967; Timmen *et al.*, 1988] avevano suggerito, rispettivamente, l’esistenza di una diversa cristallizzazione e composizione tra i globuli di grasso di diverse dimensioni, ma non erano stati in grado di separarli accuratamente.

Successivamente, Briard *et al.* [2003] impiegando tale processo, hanno dimostrato che i globuli di piccole dimensioni ($\sim 1-3 \mu\text{m}$) presentano una diversa composizione in acidi grassi totali rispetto ai globuli di dimensioni maggiori ($\sim 6 \mu\text{m}$), presenti nella stesso latte. In particolare hanno osservato che, i globuli di piccole dimensioni hanno maggiori concentrazioni di $\text{C}_{12:0}$, $\text{C}_{14:0}$ e $\text{C}_{16:1}$ e ridotte concentrazioni di $\text{C}_{18:0}$ rispetto ai globuli di dimensioni maggiori.

In seguito, anche altri Autori [Fauquant *et al.*, 2005; Michalski *et al.*, 2005a] hanno rilevato che la dimensione dei globuli potrebbe essere correlata ad una diversa composizione in acidi grassi del latte. Nello specifico, gli stessi Autori hanno riscontrato maggiori concentrazioni di acido laurico, miristico, palmitico e palmitoleico e ridotte concentrazioni di acido stearico nei globuli di piccole dimensioni nei confronti di quelli di maggiori dimensioni. Ciò naturalmente comporta delle differenze a livello delle proprietà nutrizionali, sensoriali e tecnologiche dei prodotti lattiero-caseari.

In uno studio, ad esempio, è stata valutata l’influenza della dimensione dei globuli di grasso sulle proprietà fisico-chimiche e sensoriali del formaggio Camembert, utilizzando frazioni con piccoli ($3 \mu\text{m}$) e grandi ($6 \mu\text{m}$) globuli di grasso ottenuti mediante microfiltrazione. Da tale studio è emerso che, il formaggio prodotto con globuli di piccole dimensioni si differenzia da quello prodotto con quelli di maggiori dimensioni, in quanto

ha un contenuto maggiore di umidità, la cagliata è meno rigida, compatta e gessosa, ha una proteolisi più spinta e presenta una struttura più elastica ed uniforme ed un colore più giallo. Tali risultati trovano una spiegazione nel fatto che, i globuli piccoli hanno una maggiore area di superficie, sono intrappolati in modo migliore nella matrice caseinica ed hanno una minor distanza interglobulare, che potrebbe consentire una miglior percezione del grasso. Inoltre, con una proteolisi più spinta, l'intensità dell'aroma del formaggio è maggiore, dovuta alla presenza di peptidi liberi e aminoacidi [Michalski *et al.*, 2003; Michalski *et al.*, 2007b]. In un'altra ricerca, inoltre, la media della dimensione dei globuli sembra sia stata proposta come un utile indicatore delle proprietà di coagulazione del latte [Martini *et al.*, 2008].

Pertanto l'impiego dei globuli di grasso con differenti dimensioni potrebbe portare alla nascita di nuovi prodotti con differenti proprietà tecnologiche e sensoriali, anche perchè è stato dimostrato che i globuli di piccole dimensioni hanno una più bassa temperatura di cristallizzazione e i cristalli di trigliceride sono più piccoli [Michalski, 2007a].

Inoltre sembra che, in quelli con dimensioni inferiori (1-3 μm) sono presenti più acidi grassi insaturi rispetto a quelli con dimensioni superiori (6 μm) [Michalski *et al.*, 2005a; Martini *et al.*, 2005]. Per tale motivo, la dimensione dei globuli potrebbe essere considerata come un parametro che definisce e determina la qualità nutrizionale del latte, in quanto i globuli di grasso di maggiori dimensioni potrebbero essere più sensibili agli effetti meccanici durante i processi tecnologici e, pertanto, potrebbero essere più suscettibili alla lipolisi e portare alla formazione di particolari aromi, che influenzano naturalmente il gusto, così come le proprietà fisico-chimiche del latte e del burro, attraverso l'influenza della temperatura di fusione [Carroll *et al.*, 2006].

La distribuzione dei globuli di grasso inoltre può variare in funzione di alcuni fattori come la razza, lo stadio di lattazione e le modificazioni nutrizionali [Michalski *et al.*, 2005b; Carroll *et al.*, 2006; Couvreur *et al.*, 2006].

Pertanto, la capacità di comprendere le caratteristiche fisico-chimiche, così come le proprietà strutturali e termiche dei piccoli vs i grandi globuli, può consentire lo sviluppo di nuovi prodotti alimentari con diverse proprietà sensoriali e di migliorare il controllo dei processi tecnologici.

Bisogna comunque ricordare che, la frazione lipidica ha per il latte e i suoi derivati, una fondamentale importanza tecnologica. Essa ad esempio, è una componente fondamentale

che conferisce le caratteristiche organolettiche ai formaggi, in quanto la sua presenza e la sua distribuzione condizionano tutti i parametri di caseificazione e la struttura del formaggio. In uno studio di Lopez *et al.* [2007] infatti sono state osservate le caratteristiche del grasso (composizione, organizzazione e proprietà termiche), che possono migliorare le proprietà funzionali, sensoriali e nutrizionali dei prodotti alimentari. In questa ricerca è stato osservato come i processi caseari possono influenzare sia l'organizzazione sopramolecolare che la composizione superficiale del grasso. Utilizzando la microscopia confocale è stato notato che, il grasso può essere disperso nel latte come globuli liberi, globuli aggregati, globuli omogeneizzati piccolissimi ricoperti principalmente da caseine e infine come grasso non globulare o libero. Inoltre sono stati valutati i cambiamenti che avvengono nell'organizzazione del grasso durante la produzione e la maturazione di formaggi a pasta dura. È stato osservato pertanto che, la pressatura della cagliata porta alla distruzione delle membrane e alla formazione di grasso libero, favorendo la localizzazione della microflora lipolitica all'interfaccia grasso/proteine e contribuendo alla qualità e tipizzazione del formaggio. Inoltre, impiegando la calorimetria a scansione differenziale è stato sviluppato un metodo per determinare il contenuto in grasso solido nei prodotti alimentari. È stato notato che, aumentando la concentrazione in acidi grassi insaturi per migliorare le proprietà nutrizionali del latte, il contenuto in grasso solido si modifica in funzione della temperatura e della resistenza dei globuli di grasso alla distruzione e di conseguenza, si modificano le proprietà funzionali, tessutali e sensoriali dei prodotti caseari ricchi in grasso, come il burro [Lopez *et al.*, 2007a].

La distruzione dei globuli di grasso durante la pressatura può dipendere da diversi fattori, quali: la loro dimensione, la loro aggregazione a causa di una parziale riorganizzazione della membrana, la composizione del grasso che influenza il contenuto di grasso solido; la composizione, struttura e le proprietà della membrana, la viscosità del network di caseina e i parametri della pressatura: temperatura, tempo e pressione applicata [Lopez *et al.*, 2007]. Mediante l'impiego della microscopia, pertanto, è possibile ottenere delle informazioni sulla localizzazione di diverse componenti di un preparato biologico. In particolare, la microscopia in fluorescenza permette di localizzare, in cellule o tessuti, molecole marcate con determinate sostanze, conosciute come “fluorocromi”. Inoltre oggi, con l'utilizzo della microscopia confocale è possibile esplorare la struttura tridimensionale dei preparati biologici, con la finalità di risolvere dettagli fini, di eliminare emissioni di fluorescenza

aspecifica e di ottenere sezioni di un certo spessore (fino a 200µm), senza ricorrere a drastici tagli fisici che potrebbero danneggiare la struttura [Lanni, 2008].

4.6. LA MEMBRANA DEL GLOBULO DI GRASSO

La membrana del globulo di grasso rappresenta circa il 2-6% della massa del globulo (dipende dalla sua dimensione), ha uno spessore di circa 10-20 nm, al fine di mantenere una determinata distanza tra la superficie più esterna e quella citoplasmatica più interna, ed inoltre gioca un ruolo fondamentale nella stabilità dei globuli di grasso [McPherson *et al.*, 1983; Walstra *et al.*, 1984; Keenan *et al.*, 1995].

Presenta una composizione piuttosto complessa e variabile in funzione di alcuni fattori (dieta, razza, salute, stadio di lattazione); essa è costituita principalmente da fosfolipidi, glicolipidi, proteine, lipoproteine ed enzimi [Lee *et al.*, 2002; Michalski, *et al.*, 2003; Evers, 2004; Lopez *et al.*, 2007], ed in particolare, quella del globulo di grasso del latte bovino è stata caratterizzata a partire dagli anni '70-80.

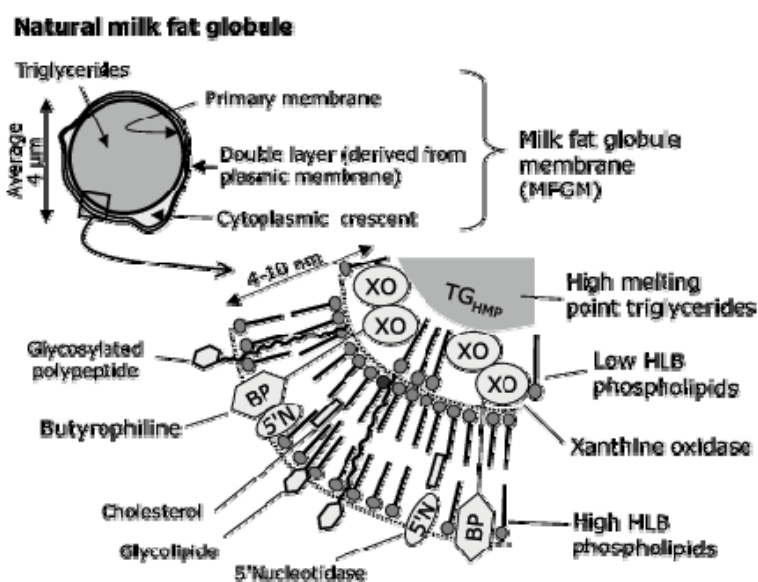


Figura 11. La membrana del globulo di grasso.

Da: Michalski *et al.*, 2001.

Le proteine di membrana sono disposte in modo asimmetrico e tra le più importanti ritroviamo la butirofilina e la xantina ossido-riduttasi (Fig.12). In studi più recenti sono state caratterizzate anche la adipofilina, la PAS 6/7 (lactaderina) e il cluster di differenziazione (CD36), la proteina mucina 1 (una proteina glicosilata) e il proteoso peptone 3 (PP3, una proteina fosforilata). Recentemente, sono state identificate altre 6 proteine minori: proteina recettore Ig polimerica, apolipoproteina E, apolipoproteina A1, 71 kDa heat-shock proteina affine, peptidilprolil isomerasi A e clusterin. Inoltre altre due proteine minori, la lattoperossidasi e la catena pesante Ig, sono state recentemente riscontrate sia nel latte umano che bovino [Fong *et al.*, 2007; Dewettinck *et al.*, 2008].

La butirofilina è la maggior proteina presente nella membrana del globulo di grasso bovino e rappresenta circa il 20-40% delle proteine totali associate alla membrana [Heid *et al.*, 2005]. Anche la xantina ossido-riduttasi è una delle maggiori proteine ed a differenza della butirofilina, è un enzima citosolico solubile. È stato purificato nel latte bovino circa 60 anni fa, è uno degli enzimi più studiati ed è ampiamente distribuito nei tessuti, in particolare nel fegato e nell'intestino. Esso è coinvolto nel catabolismo della purina, nell'ossidazione della ipoxantina a xantina e di quest'ultima ad acido urico, ed inoltre, potrebbe avere un'attività antimicrobica nell'intestino del neonato [Harrison, 2006].

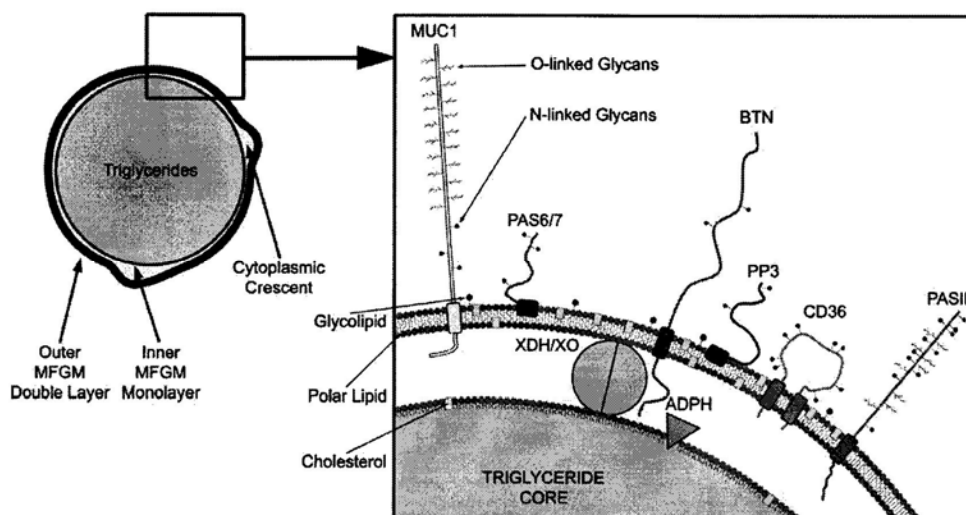


Figura 12. Struttura del globulo di grasso con disposizione delle principali proteine di membrana.

Da: Dewettinck *et al.*, 2008.

I lipidi neutri di membrana costituiscono la maggior parte dei lipidi presenti nella membrana (56–80 % dei lipidi totali) e sono soprattutto costituiti dai trigliceridi (53–74 %), la cui composizione in acidi grassi presenta una proporzione maggiore di acidi grassi saturi a lunga catena (C_{16} – C_{18}), come l'acido palmitico e lo stearico, ed una ridotta concentrazione di acidi grassi insaturi, al fine di contribuire di gran lunga alla stabilità dell'intera membrana [Fong *et al.*, 2007].

Le lipoproteine e gli steroli presentano una parte lipofila (idrofoba) e una parte proteica (idrofila), mentre i fosfolipidi, presenti in modo predominante nella componente lipidica della membrana (60-70%), accanto alla parte lipidica presentano una parte aminica, legata al fosfato, idrofila ed emulsionante. Queste sostanze disponendosi con la parte idrofila all'esterno della membrana dei globuli di grasso, concorrono a mantenere i globuli in emulsione e in sospensione nel plasma latteo. Tra quest'ultimi ritroviamo la fosfatidil-etanolamina (PE 30,5%), fosfatidil-inositolo (PI 7,1%), fosfatidil-serina (PS 5%), fosfatidil-colina (PC 31%), sfingomieline (SM 19,9%), lattosil-cerebroside (3,4%) e il glucosil-cerebroside (0,3%) [Fong *et al.*, 2007]. In particolare, le sfingomieline giocano un ruolo importante nella maturazione dell'intestino del neonato, contribuiscono al processo di mielinizzazione per lo sviluppo del sistema nervoso centrale e i suoi metaboliti sono importanti modulatori delle funzione vascolari [Dewettinck *et al.*, 2008].

In generale, la composizione in acidi grassi dei fosfolipidi comprende acidi grassi $C_{18:1}$ e/o $C_{18:2}$, che potrebbero essere essenziali per la fluidità della membrana. Inoltre è stato osservato che, il contenuto totale dei fosfolipidi e del colesterolo nelle bovine a 180 giorni di lattazione è inferiore rispetto all'inizio del ciclo e che la composizione in acidi grassi dei fosfolipidi varia durante l'intera lattazione e questo pertanto, potrebbe portare ad un cambiamento nella fluidità di membrana e alla stabilità del globulo [Evers, 2004].

La membrana dei globuli di grasso, oltre ad avere una funzione protettiva nei confronti dei globuli al fine di prevenire la coalescenza e la degradazione enzimatica, ha proprietà adsorbenti per particelle di piccole dimensioni (batteri) e agglutinanti, dovute alla presenza della agglutinine accumulate sulla membrana e tale proprietà è accresciuta dalla parziale acidificazione del latte. Al contrario, è noto che la pastorizzazione della crema a temperatura maggiori di 78°C comporta una completa inattivazione delle agglutinine, in quanto tale processo modifica la composizione della membrana e crea delle interazioni tra la β -lattoglobulina e le proteine di membrana mediante ponti disolfuro [Morin *et al.*, 2007].

La membrana naturalmente preserva l'individualità dei globuli di grasso e ne determina il comportamento in alcuni processi, ad esempio nell'affioramento della crema. Essa ha anche la funzione di proteggere i trigliceridi contenuti nella parte interna dei globuli, dalle alterazioni di origina chimica ed enzimatica che provocano, come è noto, i fenomeni di irrancidimento. Essa però può subire alterazioni in funzione di diversi fattori, quali la dieta, la razza, la salute o lo stadio di lattazione degli animali. Inoltre la sua funzionalità può essere compromessa da tutti i trattamenti meccanici violenti (omogeneizzazione, centrifugazione, etc.), che provocano una totale o parziale distruzione della membrana, provocando una destabilizzazione del grasso [Michalski *et al.*, 2002; Iametti *et al.*, 2007]. Al termine del processo di omogeneizzazione, in particolare, la superficie di una determinata quantità di globuli di grasso è ricoperta di proteine e pertanto i nuovi globuli di grasso che si formano, presentano diverse proprietà fisico-chimiche, dovute alle interazioni con le differenti componenti del latte, come le caseine e le sieroproteine associate con ponti disolfuro, che naturalmente influenzano le proprietà dei prodotti caseari [Michalski *et al.*, 2001; Evers *et al.*, 2004; Argov *et al.*, 2008].

4.7. ALTERAZIONI DEL GRASSO

Nell'ambito del settore alimentare le condizioni di conservazione dei prodotti sono un fattore di fondamentale importanza, in quanto permettono di evitare lo sviluppo di alterazioni dei prodotti stessi. La shelf-life di quest'ultimi, infatti, può essere influenzata dalla temperatura, dalla presenza di luce, di ossigeno e di metalli che favoriscono le reazioni di ossidazione, in particolar modo, a carico degli acidi grassi a lunga catena.

I grassi del latte, pertanto, possono subire alterazioni di natura chimica ed enzimatica, denominate reazioni di irrancidimento, che provocano variazioni di gusto e aroma, in genere non gradite dal consumatore. Le alterazioni più importanti che hanno conseguenze tecnologiche, igieniche e nutrizionale sono l'irrancidimento idrolitico (o lipolisi), chetonico ed ossidativo.

- L'irrancidimento idrolitico è essenzialmente di natura enzimatica, in quanto provocato dalle lipasi presenti nel latte, sia native sia di origine microbica (batteri

psicrofili), che catalizzano la lisi del legame estere dei lipidi con liberazione di glicerina e acidi grassi. A questo tipo di irrancidimento, ed in particolare agli acidi grassi volatili a corta catena (acido butirrico e caproico), sono dovute le alterazioni di gusto. Naturalmente questo fenomeno è favorito dai trattamenti e sollecitazioni di natura chimico-fisica (stress meccanici), che provocano alterazioni della membrana dei globuli di grasso, con fuoriuscita di lipidi allo stato liquido, i quali vengono così a contatto con le lipasi. Quest'ultime hanno temperatura ottimali diverse a seconda dell'origine e sono disattivate da trattamenti termici a temperature superiori a 70 °C. La lipolisi, inoltre, può verificarsi spontaneamente in base a fattori genetici, fisiologici e zootecnici. Essa è ostacolata dai metalli pesanti (che d'altro canto favoriscono l'irrancidimento ossidativo), dall'acidità lattica, dalle basse temperature, dall'ossigeno e dal sale. In alcuni casi, la liberazione di acidi grassi per azione della lipasi è desiderata, in quanto costituisce la prima fase della trasformazione dei grassi nei formaggi caratterizzati dal gusto piccante nel corso della maturazione.

- L'irrancidimento chetonico è un'alterazione di natura in parte chimica e in parte enzimatica, provocata da muffe (genere *Penicillium*) batteri e lieviti. Tale reazione ossidativa avviene solo sugli acidi grassi liberi, pertanto essa presuppone un previo irrancidimento idrolitico. L'enzima in gioco è la β -ossidasi, che facilita l'ossidazione del gruppo metilenico in posizione β rispetto al carbossile di un acido grasso. Questo enzima è prodotto da alcune muffe, alcune delle quali impiegate nella produzione di alcuni formaggi erborinati (es. Gorgonzola, Roquefort e Camembert), ai quali viene conferito l'aroma caratteristico grazie alla formazione di metilchetoni provenienti da questo tipo di irrancidimento. Questa alterazione è favorita principalmente dal riscaldamento del latte.
- L'irrancidimento ossidativo è un fenomeno di natura chimica che avviene in seguito all'assorbimento di ossigeno da parte degli acidi grassi insaturi. È un'alterazione che modifica le caratteristiche organolettiche e può portare allo sviluppo di sostanze tossiche. Si tratta essenzialmente di una reazione autocatalitica, infatti, una volta raggiunta una concentrazione critica in idroperossidi nella prima fase (fase di induzione) del fenomeno, si innesca una reazione a catena con la formazione di nuovi radicali attivati (fase di

propagazione). Dagli idroperossidi si formano prodotti secondari (fase di terminazione), quali acidi, aldeidi, chetoni insaturi e idrocarburi, tra i quali i composti responsabili del sapore di rancido. I fattori che favoriscono l'irrancidimento ossidativo sono la presenza di ossigeno (0,5 mg/100 g di grasso), le tracce di metalli pesanti (Fe, Cu, etc.), la luce solare, un elevato contenuto di acidi grassi insaturi, la bassa concentrazione di sostanze antiossidanti (fosfolipidi, grassi insaponificabili), ed infine anche la presenza di sostanze riducenti (acido ascorbico, flavine, tocoferoli, etc.). Per valutare analiticamente la fase di irrancidimento ossidativo si ricorre alla determinazione del numero dei perossidi e dei carbonili presenti.

4.8. VARIABILITÀ DELLA COMPOSIZIONE IN ACIDI GRASSI

La composizione in acidi grassi del latte bovino varia in rapporto all'influenza di diversi fattori legati alla specie (Tab. 12), alla razza [Malacarne *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 2006], alle caratteristiche lattifere individuali, all'alimentazione, alle tecniche di allevamento e alle condizioni ambientali [Palmquist *et al.*, 1993; Ferlay *et al.*, 2006; Ferlay *et al.*, 2008]. Tra quest'ultimi sono molto importanti quelli di natura alimentare: tipo di razione, modalità di somministrazione, concentrazione energetica e livello energetico della razione, stato fisico degli alimenti e dell'intera razione, quantità, qualità e lunghezza della fibra, tipo, forma fisica e trattamento dei cereali, etc. Anche l'impiego di oli e grassi protetti e di sali di calcio rivestono un ruolo determinante nel modificare la composizione in acidi grassi del latte [Malacarne *et al.*, 2001].

In particolar modo, la composizione varia durante l'anno anche in funzione dell'andamento stagionale, che determina una diversa concentrazione delle varie componenti del latte. Pertanto le differenti strategie alimentari impiegate possono influenzare gli aspetti nutrizionali, sensoriali e tecnologici della qualità del grasso del latte [Kraggerud *et al.*, 2008], che si ripercuotono, di conseguenza, sulle produzioni lattiero-caseari, ed in particolar modo sulla produzione dei formaggi, le cui caratteristiche tecnologiche e organolettiche dipendono dalla composizione in acidi grassi del latte di partenza.

Tabella 12. Effetto della specie sulle caratteristiche nutrizionali del latte.

Acidi grassi	Latte caprino			Latte bovino		
	Min.	Media \pm DS	Max.	Min.	Media \pm DS	Max.
SFA	67,4	71,8 \pm 2,4	77,8	56,9	68,2 \pm 5,0	78,1
C _{4:0}	1,53	2,51 \pm 0,4	3,23	3,22	3,74 \pm 0,3	4,85
C _{6:0}	2,26	2,61 \pm 0,3	3,23	1,60	2,29 \pm 0,2	2,76
C _{8:0}	2,84	3,24 \pm 0,3	3,84	0,87	1,42 \pm 0,2	1,86
C _{10:0}	8,43	10,5 \pm 1,2	12,5	1,63	3,01 \pm 0,6	4,12
C _{12:0}	3,33	4,98 \pm 1,0	6,85	1,91	3,42 \pm 0,8	5,06
C _{14:0}	8,76	11,0 \pm 1,1	12,8	7,04	11,6 \pm 1,7	14,6
C _{16:0}	20,7	23,4 \pm 1,9	26,4	21,8	29,0 \pm 3,6	39,0
C _{18:0}	6,61	9,58 \pm 1,9	14,0	5,94	9,54 \pm 1,8	13,9
MUFA	17,4	22,9 \pm 2,1	27,2	18,7	27,0 \pm 4,1	35,4
C _{18:1} c9	13,1	18,2 \pm 1,9	22,2	13,0	19,1 \pm 3,2	25,3
C _{18:1} t11(+t10)	0,65	1,07 \pm 1,97	1,97	0,96	1,92 \pm 1,0	4,76
PUFA	3,33	4,24 \pm 0,5	5,08	2,54	3,87 \pm 1,0	6,43
C _{18:2} c9 c12	1,47	2,28 \pm 0,4	2,82	1,17	1,58 \pm 0,3	2,18
C _{18:2} c9 t11 (CLA)	0,36	0,50 \pm 0,1	0,71	0,33	0,77 \pm 0,4	1,77
C _{18:3} c9 c12 c15	0,43	0,82 \pm 0,3	1,39	0,33	0,74 \pm 0,3	1,32

Da: Lucas *et al.*, 2006.

Un fattore rilevante è rappresentato anche dalla natura dei foraggi [Lourenco *et al.*, 2008] impiegati a livello dell'alimentazione dei ruminanti, in quanto la composizione botanica, lo stadio di maturità e la tecnica di conservazione possono influire in maniera considerevole sulla composizione in acidi grassi, vitamine e carotenoidi.

La natura dei foraggi è quindi un fattore critico, basti pensare alla differenza fra il pascolo di montagna e quello di pianura. In uno studio [Antongiovanni *et al.*, 2002], infatti, è stato dimostrato che, il pascolo di montagna è migliore rispetto a quello di pianura per quanto riguarda il contenuto di acido butirrico, laurico, miristico, palmitico, stearico ed oleico, non tralasciando naturalmente, le concentrazioni di acido linoleico e linolenico. Pertanto, le

caratteristiche organolettiche dei prodotti caseari sono migliori ed il burro presenta un miglior grado di spalmabilità.

I foraggi freschi, in particolare, contengono circa l'1%-3% di acidi grassi, in particolar modo, in primavera ed in autunno, e la maggior parte di tali acidi è rappresentato dall'acido α -linolenico. Ciò comporta, come è stato dimostrato, l'aumento della concentrazione degli acidi grassi a lunga catena e la riduzione, contemporaneamente, della sintesi *de novo* degli acidi grassi a corta e media catena nella ghiandola mammaria [Khanal *et al.*, 2008; Palmquist *et al.*, 2008].

Particolarmente significative, inoltre, sono le variazioni legate allo stato fisiologico delle bovine, specie con riferimento alle variazioni di alcuni acidi grassi (es. acido oleico, linoleico e linolenico), nel confronto tra le fasi iniziali e la fase finale della lattazione. Da alcuni studi, infatti, [Secchiari *et al.*, 2002] è emerso che lo stato di lattazione rientra tra i principali fattori di variazione della composizione in acidi grassi del latte, in quanto, com'è noto, all'inizio della lattazione le bovine sono in bilancio energetico negativo e questo comporta una mobilitazione delle riserve adipose e l'incorporazione nel grasso del latte degli acidi grassi a lunga catena in esse contenuti. L'aumento di questa frazione prelude alla riduzione della sintesi *de novo* degli acidi grassi a corta catena nel tessuto mammario, la quale è influenzata in maniera differente a seconda del numero di atomi di carbonio interessati. Questo fenomeno naturalmente tende ad attenuarsi con il progredire della lattazione e il raggiungimento del bilancio energetico positivo.

Per quanto riguarda le diverse tecnologie di produzione casearia non sono state osservate variazioni rilevanti [Collomb *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2006], in quanto non è stato osservato alcun effetto sulle diverse componenti del latte, ad eccezione dei minerali e dei folati.

Un altro aspetto osservato e preso in considerazione negli ultimi anni, è stata la relazione tra la composizione in acidi grassi e il diverso polimorfismo genetico delle proteine del latte [MacGibbon *et al.*, 1997; Bobe *et al.*, 1999; Bobe *et al.*, 2004]. In uno studio ad esempio è stato dimostrato che il polimorfismo genetico della caseina α_{s1} ha importanti effetti sulla composizione in acidi grassi del latte caprino e in particolar modo, a livello degli acidi grassi a media catena e a livello dell'enzima Δ^9 desaturasi [Chilliard *et al.*, 2006]. In un altro studio ancora [Bobe *et al.*, 2004] è stata ipotizzata una associazione tra i diversi fenotipi per κ -caseina e per β -lattoglobulina e la composizione in acidi grassi del

latte bovino, con speciale riferimento alla presenza di alcuni acidi grassi sintetizzati a livello della ghiandola mammaria.

Studi relativi su quest'ultimo argomento sono ancora scarsi in letteratura, ma potrebbero essere utili soprattutto nell'ambito della produzione industriale, in quanto è stato osservato che, le differenze a livello della composizione in acidi grassi potrebbero essere impiegati per il controllo delle proprietà di fusione dei prodotti alimentari, come ad esempio il burro [Bobe *et al.*, 2003].

4.8.1. L'IMPORTANZA A LIVELLO NUTRIZIONALE DEGLI ACIDI GRASSI

Sebbene i prodotti lattiero-caseari forniscono solo il 15-25% del grasso totale nell'alimentazione umana, quest'ultimi procurano il 25-35% degli acidi grassi saturi totali, che se consumati in eccesso, potrebbero giocare un ruolo determinante nello sviluppo delle malattie cardiovascolari [Chilliard *et al.*, 2000; Ferlay *et al.*, 2008].

La qualità nutrizionale dei prodotti lattiero-caseari dipende, in parte, dalla composizione in acidi grassi del latte. Gli acidi grassi, come abbiamo visto, si distinguono in funzione della lunghezza della catena e del grado di insaturazione in:

- Acidi grassi a corta catena, che comprendono dall'acido butirrico all'acido caprilico ($C_{4:0}$ – $C_{8:0}$);
- Acidi grassi a media-lunga catena, che considerano dall'acido caprico all'acido palmitico ($C_{10:0}$ - $C_{16:0}$);
- Acidi grassi a lunga catena, che comprendono gli acidi grassi con 18, ed oltre, atomi di carbonio ($C_{18:0}$ >).

La composizione in acidi grassi del latte ha, pertanto, diversi effetti sulla qualità (comprese le proprietà fisiche: punto di fusione, cristallizzazione e frazionamento della frazione lipidica del latte), sulle caratteristiche organolettiche, così come sulle proprietà nutrizionali. Tra gli acidi grassi a corta catena, ad esempio, quello più rappresentativo è

l'acido butirrico, al quale è stato riconosciuto, in alcuni studi, il ruolo protettivo della mucosa del colon [Ballarini, 1998; Russo *et al.*, 1999; Parodi, 1999].

Gli acidi grassi a media catena, invece, hanno principalmente funzioni metaboliche ed energetiche, anche se in alcuni studi, è stato riscontrato l'effetto ipercolesterolemico dell'acido laurico, miristico e palmitico, dovuto all'aumento del colesterolo LDL, mentre l'acido stearico sembra essere neutrale e non avere un effetto aterogenico, nonostante sia un acido grasso saturo [Mensink *et al.*, 1998]. In particolare, l'acido laurico e l'acido palmitico sono considerati a media nocività per la salute umana, a differenza dell'acido miristico, considerato il peggiore di tutti per la sua nocività [Ulbricht *et al.*, 1991].

Per quanto riguarda gli acidi grassi monoinsaturi, diversi studi [Secchiari *et al.*, 2002] sono stati mirati alla determinazione dei loro effetti sulla salute umana ed alcuni di essi hanno affermato che i MUFA (acidi grassi monoinsaturi) sono in grado di ridurre il livello serico di colesterolo in maniera analoga ai PUFA (acidi grassi polinsaturi), ma al contrario dei PUFA ω -6, non abbassano il livello di HDL [Mensink *et al.*, 1998]. Quest'ultimo aspetto è molto importante perché le HDL esercitano un ruolo protettivo nei confronti delle malattie coronariche, in quanto per effetto della loro funzione di trasporto inverso del colesterolo, sono in grado di rimuovere il colesterolo stesso dalle cellule periferiche e di ridurre l'entrata delle LDL nelle pareti dei vasi. Il ruolo protettivo degli acidi grassi insaturi in generale e dell'acido oleico in particolare, nei confronti di diverse patologie, è da mettere in relazione al mantenimento dell'integrità funzionale delle membrane cellulari. In generale, una maggiore insaturazione delle membrane cellulari porta ad un incremento della loro fluidità con conseguente aumento del metabolismo cellulare ed, inoltre, ad un aumento del tasso di divisione cellulare.

Gli acidi grassi polinsaturi del latte, pertanto, oltre ad avere funzioni energetiche, metaboliche e strutturali, hanno rilevanti attività salutistiche, in particolare di tipo extranutrizionale. Per quanto riguarda le attività antinfettive, alcuni studi hanno dimostrato l'importanza dell'acido linoleico coniugato (CLA) nella prevenzione del calo peso dovuto a infezioni e a stimolazione del sistema immunitario [Ballarini, 2000]. Oggi è noto infatti che l'acido linoleico e in particolare l'acido linoleico coniugato, noto anche per le sue attività anticancerogene e le sue proprietà antiossidanti, svolge azioni di protezione metabolica in caso di infezioni, vaccinazioni e stimolazione del sistema immunitario.

Un'altra funzione extranutrizionale riguarda le attività ormonali dei grassi del latte, le quali possono essere dirette o indirette. Quelle dirette derivano soprattutto dagli ormoni naturali, di tipo liposolubile e soprattutto di tipo steroideo (estrogeni, etc.) e dai fitormoni presenti nell'alimentazione degli animali. Quelle indirette invece sono da collegare ad alcune vitamine liposolubili (vit. D) ed al colesterolo, in quanto base biochimica degli ormoni steroidei (es. ormoni sessuali, corticosteroidi, etc.).

Altre attività molto importanti sono le attività psicodietetiche svolte dai grassi, i quali oltre ad apportare energia, partecipano in modo attivo alla costruzione delle membrane cellulari ed hanno un ruolo essenziale a livello del sistema nervoso, soprattutto durante la fase del suo sviluppo. Le membrane cellulari infatti sono costituite principalmente da lipidi e proteine, ed in particolare, i fosfolipidi rappresentano circa il 60 % dei lipidi di membrana. Più di 1/3 degli acidi grassi dei fosfolipidi è costituito da acidi grassi essenziali, con particolare preminenza degli acidi linoleico e α -linolenico. Tali acidi grassi di membrana, detti anche strutturali, sono estremamente importanti nell'alimentazione e in una dieta equilibrata dovrebbero coprire gran parte del fabbisogno lipidico. Tra gli organi che, in particolar modo, durante il loro sviluppo risentono delle carenze degli acidi grassi essenziali, troviamo il cervello, l'organo in assoluto più ricco di grassi come tutto il sistema nervoso, il quale ricava energia prevalentemente dal glucosio ematico. Pertanto una carenza degli acidi polinsaturi alimentari è particolarmente dannosa nel periodo in cui si realizza lo sviluppo cerebrale, immediatamente dopo la nascita e nei primi anni di vita.

Per quanto riguarda le attività anticancerogene dei grassi, alcuni studi hanno dimostrato che diverse componenti del grasso hanno caratteristiche anticancerogene. I più importanti sono l'acido linoleico coniugato, le sfingomieline, l'acido butirrico e gli eteri lipidici (alchilgliceroli ed alchilglicerolfosfolipidi e loro derivati).

L'acido linoleico, in particolare, è un acido grasso polinsaturo essenziale che insieme all'acido α -linolenico, anch'esso polinsaturo essenziale, rappresentano i capostipiti rispettivamente delle serie polinsature ω -6 ed ω -3 [Antongiovanni *et al.*, 2002]. Gli acidi linoleico e α -linolenico sono contenuti in quantità differenti nella carne e nel latte e sono assorbiti a livello intestinale praticamente inalterati. Essi rivestono notevole importanza perché sono i precursori dei PUFA ed i loro derivati polinsaturi biologicamente più attivi sono l'acido arachidonico $C_{20:4}$ ω -6 per la serie ω -6, gli acidi eicosapentaenoico $C_{20:5}$ ω -3 (EPA) e docosaesaenoico $C_{22:6}$ ω -3 (DHA) per la serie ω -3. Inoltre assolvono essi stessi

importanti funzioni: l'acido linoleico entra, infatti, a far parte dei complessi lipidici che concorrono a formare le barriere di permeabilità dell'epidermide, mentre una carenza di acido α -linolenico potrebbe rappresentare un significativo fattore di rischio nei confronti di malattie cardiache, tumori e disturbi delle funzioni neurologiche sia nei bambini, sia negli adulti.

4.8.2. I CLA (CONJUGATED LINOLEIC ACIDS) NEL LATTE

Negli ultimi tempi è stato osservato un aumento del numero di studi e di ricerche (oltre 2.000 articoli) rivolte agli effetti benefici esercitati da alcuni acidi grassi essenziali; tra quest'ultimi è possibile ricordare l'acido linoleico (C_{18:2} *cis*-9, *cis*-12), che non essendo sintetizzato dal nostro organismo deve essere introdotto attraverso un'adeguata alimentazione. Questo acido grasso è il precursore dei CLA (conjugated linoleic acids), intendendo con tale acronimo l'insieme degli isomeri di posizione e geometrici dell'acido linoleico con doppi legami coniugati [Parodi, 1997]. Nell'ambito dei CLA, il *cis*-9, *trans*-11 (acido rumenico) è l'unico acido grasso che presenta in maniera inequivocabile attività anticarcinogena in esperimenti realizzati su animali [Banni *et al.*, 1999; Kelsey *et al.*, 2003; Destailats *et al.*, 2005; Jenkins *et al.*, 2006] e si è dimostrato attivo anche verso altre patologie, come l'aterosclerosi, il diabete, l'obesità, mostrando elevate capacità di interferire positivamente con il sistema immunitario [Melis *et al.*, 2003]. Per di più, a differenza degli altri isomeri che hanno un'origine esogena, grazie alla presenza nel rumine del batterio *Butyrivibrio fibrisolvens* che è in grado di convertire per via enzimatica l'acido linoleico, largamente presente nella componente foraggiera della dieta dei ruminanti, in CLA, l'acido rumenico può avere un'origine endogena (ghiandola mammaria e tessuto adiposo) a partire dall'acido vaccenico C_{18:1} *trans*-11, in seguito all'azione dell'enzima Δ^9 desaturasi, anche denominato Stearoyl-CoA-Desaturasi (SCD) [Jianget *et al.*, 1996; Griinari *et al.*, 2000; AbuGhazaleh *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2004; Whitlock *et al.*, 2006].

Inoltre è stato dimostrato con certezza che compete con l'acido linoleico riducendo la formazione dell'acido arachidonico, precursore degli eicosanoidi che svolgono un ruolo

importante nella carcinogenesi [Secchiari *et al.*, 2002]. Alcune prove sperimentali effettuate sui ratti, dimostrerebbero che l'isomero *cis*-9, *trans*-11 è un promotore della crescita, in quanto agisce positivamente sull'efficacia di utilizzo dei nutrienti, senza modificare la composizione corporea. Al contrario l'isomero *trans*-10, *cis*-12 modifica la composizione corporea facendo aumentare la massa magra e riducendo quella grassa. Quest'ultimo isomero infatti è stato oggetto di molti studi, perché è un potente inibitore della sintesi del grasso del latte.

Fra le attività dei CLA (principalmente dei due isomeri) si ritrovano anche quella antiaterogenica ed ipocolesterolemica, in quanto è stata osservata una diminuzione del livello di colesterolo LDL nel plasma con conseguente decremento della formazione di placche aterosclerotiche in ratti alimentati con diete arricchite con questo acido grasso.

Gli effetti positivi sul diabete invece sono correlati al miglior utilizzo del glucosio presente nel plasma ed a una maggiore efficienza dell'insulina.

Nel latte dei ruminanti e nei suoi derivati la presenza dei CLA è più elevata rispetto a quella presente nella carne e circa l'80-90% è rappresentato dall'isomero *cis*-9, *trans*-11 [Jiang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006a; Zhanget *al.*, 2006b]. Naturalmente la variazione del contenuto dei CLA risente dell'andamento stagionale [Thorsdottir *et al.*, 2004; Chamba *et al.*, 2006] e risulta anche influenzata dall'alimentazione, dallo stadio di lattazione e dalla razza [Delmonte *et al.*, 2000; Collomb *et al.*, 2002; Kelsey *et al.*, 2003; Bernal-Santos *et al.*, 2003]. Per quanto riguarda quest'ultima infatti, benché la capacità di sintetizzare acido rumenico a partire dal suo precursore sembri essere comune a molte specie, esistono tuttavia differenze sostanziali che vedono, ad esempio, il grasso del latte e dei tessuti di animali appartenenti alle specie ruminanti, caratterizzato da contenuti più elevati di acido rumenico rispetto ai monogastrici (Tab.13). In particolare, il latte che contiene la maggior quantità di CLA e, pertanto di acido rumenico, è quello ovino, seguito da quello bovino e da quello caprino. Nell'ambito dei monogastrici invece è il latte di donna a contenere la quantità più elevata di CLA [Mele *et al.*, 2002].

Tabella 13. Contenuto medio di CLA nel latte di differenti specie.

	Ruminanti				Non ruminanti		
	Pecora	Vacca	Dromedaria	Capra	Donna	Scrofa	Cavalla
CLA (g/100g grasso)	1,2%	0,7%	0,7%	0,6%	0,4%	0,2%	0,1%

Da: Mele *et al.*, 2002.

Pertanto i ricercatori del settore zootecnico hanno cercato di realizzare strategie alimentari e regimi dietetici per i ruminanti finalizzati all'incremento di questi acidi grassi nel latte e di conseguenza nei suoi derivati [Perfield *et al.*, 2004; Piperova *et al.*, 2004; Khanal *et al.*, 2005], agendo in particolare modo, sulla composizione della razione alimentare [Lawless *et al.*, 1998; Dhiman *et al.*, 1999; De Veth *et al.*, 2005; Loores *et al.*, 2005; Rego *et al.*, 2005].

4.8.3. GLI ω -6 E ω -3 NEL LATTE

Nell'ambito degli acidi grassi polinsaturi (PUFA), riconosciuti fondamentali per l'organismo umano, ritroviamo gli acidi grassi della serie ω -6 (acido linoleico LA C_{18:2}, γ -linolenico C_{18:3} e arachidonico AA C_{20:4}) e della serie ω -3 (l' α -linolenico ALA C_{18:3}, l'eicosapentaenoico EPA C_{20:5} e il docosaesaenoico DHA C_{22:6}). Questi acidi grassi sono definiti essenziali, poiché non possono essere sintetizzati dai mammiferi, ma devono essere introdotti obbligatoriamente con la dieta. È noto che, una fonte di notevoli quantità di ω -3 è rappresentata dalle microalghe marine, con rilevanti differenze quali-quantitative tra le varie specie. Anche il grasso degli organismi acquatici, rispetto a quello dei vertebrati omeotermi è caratterizzato dalla presenza di una maggiore quantità di PUFA e fra questi, soprattutto di EPA e di DHA. L'alto contenuto di questi acidi grassi nel pesce è una conseguenza del consumo di fitoplancton (ricco di ω -3), il quale contribuisce anche all'adattamento del pesce alle temperature d'acqua fredda. Pertanto il contenuto degli acidi grassi polinsaturi ω -3 varia a seconda della specie ittica (tonno, aringa, sardine, salmone,

pesce azzurro, sgombrò), dalla stagione dell'anno e dalla disponibilità del fitoplancton [López Huertas *et al.*, 2003]. L' α -linolenico (Fig.13) invece si ritrova principalmente nei vegetali di color verde scuro (spinaci, lattuga), nell'olio dei semi di lino (57% degli acidi grassi totali), nei semi di colza, di soia, nel germe di grano, nelle noci (che contengono dal 7 al 13% di ALA). In particolare l'olio di soia, per la sua particolare composizione acidica, può essere considerato una importante fonte di acidi grassi ω -3, presenti soprattutto sotto forma di acido α -linolenico [Caponio *et al.*, 2003].

Gli acidi grassi ω -6 (LA, AA) invece hanno come fonte alimentare i cereali, le uova, il pollo, la maggior parte degli oli vegetali, le granaglie, i cibi cotti al forno, i cibi fritti e la margarina [López Huertas *et al.*, 2003].

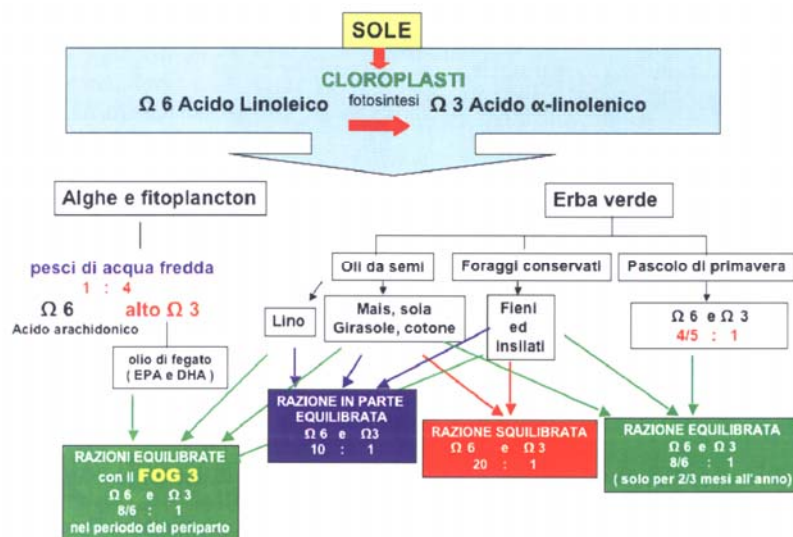


Figura 13. Biosintesi e distribuzione dei PUFAs

Da: Gabaldo *et al.*, 2007.

Per quanto riguarda la sintesi degli acidi grassi ω -3 ed ω -6 (acido linoleico $C_{18:2}$, γ -linolenico $C_{18:3}$ e arachidonico $C_{20:4}$), quest'ultima avviene in modo indipendente a partire dai due rispettivi precursori (acido α -linolenico ALA ed acido linoleico LA rispettivamente), ma le vie metaboliche competono per gli stessi enzimi che risultano

importanti per le reazioni di elongazione e di desaturazione, che avvengono a livello della catena molecolare (Fig. 14 e 15).

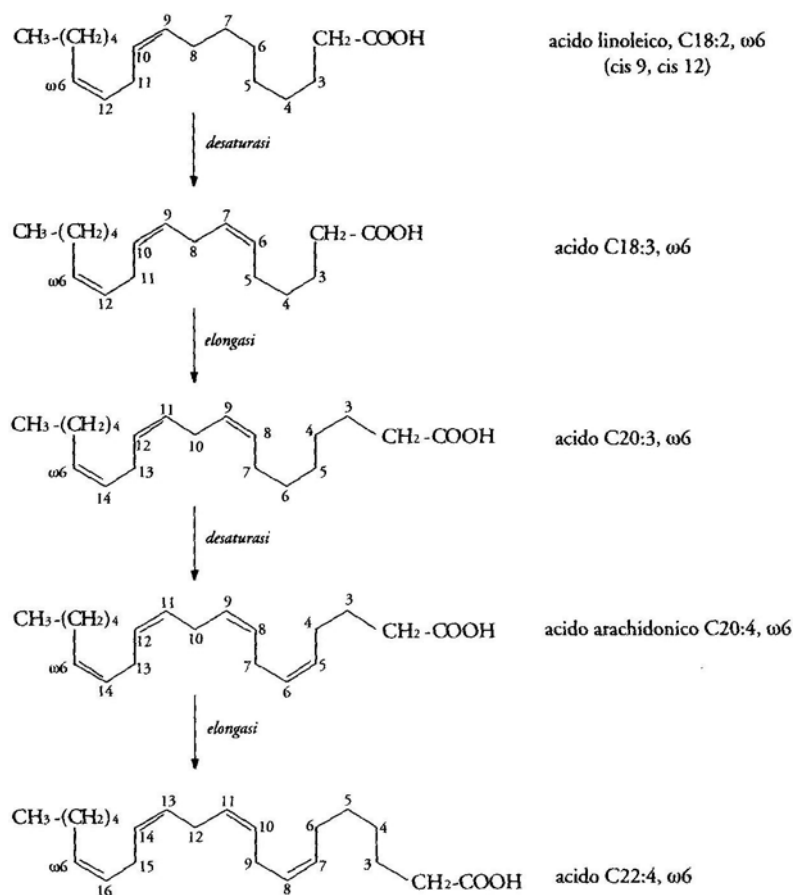


Figura 14. Genesi degli acidi grassi polinsaturi ω-6.

Da: Antongiovanni *et al.*, 2002.

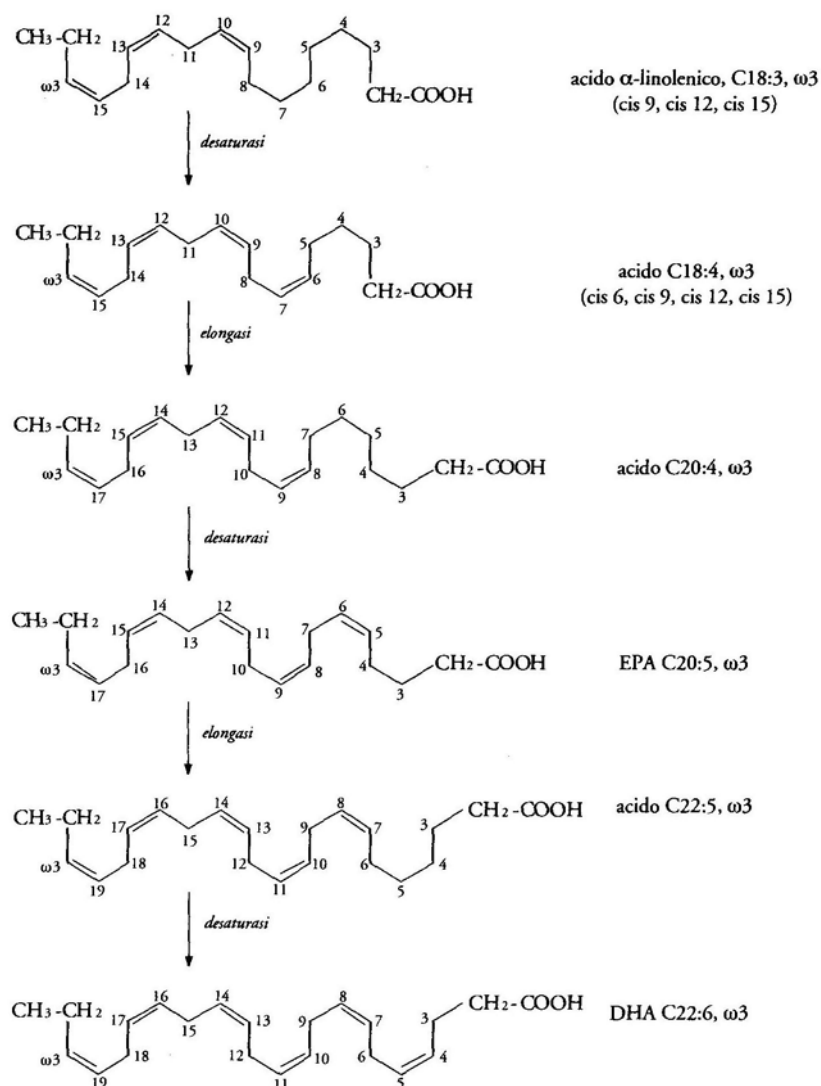


Figura 15. Genesi degli acidi grassi polinsaturi ω -3.

Da: Antongiovanni *et al.*, 2002.

Pertanto, una variazione della dieta che favorisce la produzione di acidi grassi appartenenti alla serie ω -3 determina, non solo un aumento degli acidi di detta serie, ma anche una diminuzione degli acidi della serie ω -6 [Secchiari *et al.*, 2002; Stam *et al.*, 2003; Lòpez Huertas *et al.*, 2003; Gabaldo *et al.*, 2007].

Essendo una fonte di energia, gli acidi grassi ω -6 ed ω -3 sono incorporati nelle membrane cellulari, dove attraverso le reazioni catalizzate dagli enzimi cicloossigenasi e lipoossigenasi, generano sostanze ad azione ormone-simile come le prostaglandine, le

prostaciline, i trombosani e leucotrieni (eicosanoidi), coinvolti nell'ampia gamma dei normali processi fisiologici, come la coagulazione del sangue, e nelle reazioni infiammatorie e immunologiche.

Diversi studi hanno evidenziato le proprietà anti-aterogeniche, anti-trombotiche ed anti-infiammatorie degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena ω -3. L'acido arachidonico, molto rappresentato nella carne di varie specie, ha un effetto contrapposto sulla salute umana. Esso infatti svolge delle funzioni importanti nella fase fetale, in quanto una sua carenza comporta rischi a livello di disordini nervosi, psicomotori e dello sviluppo motorio, ma è precursore di tutta una serie di composti biologicamente attivi come gli eicosanoidi del gruppo 2 ed i leucotrieni del gruppo 4. Alcuni composti come le prostaglandine E_2 (PGE_2), appartenenti agli eicosanoidi del gruppo 2, hanno un ruolo importante (e negativo) nell'ambito del processo di risposta immunitaria. Infatti inducono il catabolismo delle proteine muscolari associato alla risposta immunitaria stessa. Inoltre, l'acido arachidonico è precursore di un altro composto appartenente agli eicosanoidi della serie 2, il Trombosano A_2 (TXA_2), conosciuto come un fortissimo aggregante piastrinico. Questi sono tutti fattori, pertanto, che favoriscono la formazione di trombi (pro-trombotici), mentre al contrario, gli eicosanoidi di tipo 3 derivati dall'EPA sono meno pro-infiammatori e meno pro-trombotici.

I ricercatori, pertanto, hanno osservato gli effetti benefici degli ω -3, che risultano in particolar modo evidenti, a livello delle malattie cardio-vascolari, del livello del colesterolo e dei trigliceridi. Questi acidi grassi tendono a ridurre anche l'ipertensione, dovuta ad un abbassamento del livello globale della pressione sanguigna, migliorano l'artrite reumatoide, la depressione e i sintomi di altre malattie mentali e sono attivi anche verso altre patologie.

Per questo motivo è stata considerata la possibilità di arricchire diversi tipi di prodotti alimentari, regolarmente utilizzati da gran parte della popolazione [Berra *et al.*, 2003]. Tra quest'ultimi, il cui consumo ha diverse finalità, ritroviamo il latte. Da diversi studi è stato infatti riscontrato che, modificando la composizione in acidi grassi della frazione lipidica attraverso la razione alimentare, gli animali (in particolare i bovini) alimentati con razioni a base di foraggio fresco, presentano un maggior contenuto in PUFA ω -3 (acido α -linolenico ed EPA) nel tessuto adiposo ed in particolare nei fosfolipidi. Al contrario diete a base di cereali comportano un aumento di PUFA ω -6.

Quando non è possibile l'utilizzo dei foraggi freschi, l'unica alternativa è l'aggiunta nella razione di olio di fegato di pesce, ricco di acidi grassi polinsaturi a lunga catena, opportunamente protetto al fine di non peggiorare le performances degli animali e la concentrazione di grasso nel latte.

Inoltre non bisogna dimenticare che, gli studiosi sono concordi nell'individuare nell'evoluzione alimentare dell'uomo, tre eventi principali: la rivoluzione agricola, la rivoluzione industriale e infine la rivoluzione dei fast-food del ventesimo secolo, per la quale, la qualità della dieta umana è cambiata in maniera drammatica, tendendo alla "globalizzazione" [Antongiovanni *et al.*, 2002].

Pertanto oggi è possibile rilevare sul mercato l'aumento costante dei cosiddetti "functional foods", arricchiti di acido α -linolenico, EPA e DHA. Ciò è stato possibile grazie all'impiego delle tecnologie alimentari moderne, che rendono possibile l'arricchimento in acidi grassi ω -3 di qualsiasi alimento a livello mondiale. In particolare, in Europa i prodotti funzionali sono rappresentati dai prodotti da forno (pane), dalle creme, dalle uova e dagli ovoprodotti, dalla pasta, dai sughi, dai succhi e dalle bevande leggere, dai prodotti carnei e di pollame e naturalmente dal latte e derivati.

CAPITOLO 5

PARTE SPERIMENTALE

5.1. INTRODUZIONE

Numerosi studi sono stati realizzati sulla frazione lipidica del latte, considerata una componente fondamentale dal punto di vista nutrizionale nell'alimentazione umana ed un elemento chiave nell'ambito della struttura e dell'aroma di molti prodotti lattiero caseari [Michalski, 2007].

Se consideriamo in particolar modo il latte vaccino, quest'ultimo presenta una percentuale di grasso che varia dal 3,5 al 4%, con ampie oscillazioni individuali e stagionali e si ritrova nel latte come emulsione sottoforma di globuli sferici, la cui sintesi avviene a livello delle cellule secernenti dell'epitelio della ghiandola mammaria [McPherson *et al.*, 1983; Walstra *et al.*, 1984; Danthine *et al.*, 2000; Secchiari *et al.*, 2002]. La dimensione dei globuli di grasso varia da 0,1 μm a 20 μm , con una media di circa 3-4 μm e può essere influenzata dalla razza, dallo stadio di lattazione, dall'alimentazione e dalla stagione. La struttura di tali globuli non è omogenea, ma lamellare concentrica, dovuta alla sovrapposizione di strati di trigliceridi e alla presenza di una membrana che avvolge il globulo di grasso [Corradini, 1995; Salvadori del Prato, 2005]. Quest'ultima ha uno spessore di circa 10-20 nm, presenta una composizione piuttosto complessa e variabile in funzione di alcuni fattori (dieta, razza, salute, stadio di lattazione) e gioca un ruolo fondamentale nella stabilità dei globuli di grasso [Corradini, 1995; Lee *et al.*, 2002; Michalski, *et al.*, 2003; Evers, 2004].

Se si considerano gli acidi grassi presenti nel grasso del latte, questi originano da diverse fonti [Secchiari *et al.*, 2002; Corl *et al.*, 2006] e come è noto, la frazione lipidica in generale e la composizione in acidi grassi in particolare risentono dell'influenza di diversi fattori sia endogeni (razza, caratteristiche lattifere individuali, stato di salute, stadio di

lattazione) che esogeni (condizioni ambientali e management aziendale, con particolare riferimento al tipo di alimentazione).

Pertanto negli ultimi anni è stato osservato un aumento delle ricerche rivolte alla relazione tra la composizione in acidi grassi e le altre componenti del latte, principalmente alla loro interazione ed alla loro influenza sulle proprietà tecnologiche e sensoriali [Mariani *et al.*, 1987; Pecorari *et al.*, 1990; Mayer *et al.*, 1997; Mariani *et al.*, 1999]. Uno dei filoni di ricerca preso in questo senso in considerazione è stato quello relativo alla relazione tra la composizione in acidi grassi e il diverso polimorfismo genetico delle proteine [MacGibbon *et al.*, 1997; Bobe *et al.*, 1999; Bobe *et al.*, 2004; Chilliard *et al.*, 2006]. In uno studio di Bobe *et al.* [2004] in particolare è stata infatti ipotizzata una associazione tra i diversi fenotipi per κ -caseina e per β -lattoglobulina e la composizione in acidi grassi del latte, con speciale riferimento alla presenza di alcuni acidi grassi sintetizzati a livello della ghiandola mammaria.

Come è noto, con il termine polimorfismo si intende la presenza di molte forme genetiche di una stessa proteina, che si distinguono tra loro per la sostituzione o la delezione di alcuni aminoacidi all'interno della catena polipeptidica [Alais, 2000].

Se consideriamo le caseine, in particolare la κ -Cn, delle 11 varianti genetiche riscontrate con tecniche elettroforetiche, quelle con una frequenza maggiore sono rappresentate dalle varianti A e B. Quest'ultima differisce dalla variante A per la sostituzione dell'aminoacidico isoleucina con la treonina in posizione 136 e dell'alanina con l'acido aspartico in posizione 148 [Farrell *et al.*, 2004]. Come è noto da diversi studi, la variante B è quella considerata più favorevole per il latte destinato alla trasformazione casearia, in quanto determina la formazione di micelle caseiniche più piccole che coagulano più velocemente e formano un coagulo più consistente, determinando una maggior resa in formaggio [Morini *et al.*, 1975; Mariani *et al.*, 1976; Morini *et al.*, 1983; Schaar *et al.*, 1985; Castagnetti *et al.*, 1986]. Queste caratteristiche attribuite alla variante B sono state confermate anche in altri studi più recenti [Mariani *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1999; Gastaldi *et al.*, 2003].

Nell'ambito delle sieroproteine, la proteina più rilevante è rappresentata dalla β -Lg. Da quando Aschaffenburg and Drewry [1955] hanno riscontrato per la prima volta il polimorfismo della stessa, 11 varianti genetiche di quest'ultima sono state identificate fino ad oggi [Godovac-Zimmermann *et al.*, 1990; Godovac-Zimmermann *et al.*, 1996; Ng-

Kwai-Hang *et al.*, 1992] e la variante A e la variante B risultano essere le più frequenti. In particolare quest'ultima si differenzia dalla A per la sostituzione dell'aminoacido glicina con l'acido aspartico in posizione 64 e dell'alanina con la valina in posizione 118 [Farrell *et al.*, 2004].

Un altro filone di ricerca è stato quello relativo alla relazione tra la composizione in acidi grassi e la diversa dimensione dei globuli di grasso nel latte. In particolar modo, alcune ricerche hanno dimostrato una maggior concentrazione di acido laurico, miristico, palmitico e palmitoleico e una ridotta concentrazione di acido stearico nei globuli di grasso di piccole dimensione rispetto a quelli di grandi dimensioni [Briard *et al.*, 2003; Fauquant *et al.*, 2005; Michalski *et al.*, 2005; Michalski *et al.*, 2007b].

Negli ultimi anni infatti la diversa dimensione dei globuli di grasso è stata oggetto di diversi studi in quanto è stato osservato che, le differenze collegate a quest'ultimo aspetto hanno un notevole interesse sia a livello delle proprietà nutrizionali sia a livello delle caratteristiche tecnologiche e sensoriali per la produzione dei prodotti lattiero-caseari [Michalski *et al.*, 2003; Cecchi *et al.*, 2005; Martini *et al.*, 2005; Fauquant *et al.*, 2005].

Pertanto l'impiego dei globuli di grasso con differenti dimensioni potrebbe portare alla nascita di nuovi prodotti con differenti proprietà tecnologiche e sensoriali e per tale motivo, la dimensione dei globuli potrebbe essere considerata come un parametro che definisce e determina la qualità nutrizionale del latte.

5.2. SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di verificare l'esistenza di una possibile associazione tra il polimorfismo genetico delle proteine e la composizione in acidi grassi del latte bovino e di confermare, pertanto, i risultati ottenuti da Bobe *et al.* [2004], attraverso lo studio della composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg. Obiettivo prioritario del lavoro è stato pertanto quello di verificare se la composizione in acidi grassi risulta effettivamente associata anche ad un diverso polimorfismo genetico e di valutare inoltre se la variabilità di

alcuni acidi grassi più significativi può influenzare la composizione e le proprietà chimico-fisiche del grasso del latte.

Nel corso dello studio sulla frazione lipidica del latte bovino, è stata inoltre studiata la distribuzione della dimensione dei globuli di grasso nel latte bovino, in quanto secondo alcuni Autori [Briard *et al.*, 2003; Fauquant *et al.*, 2005; Michalski *et al.*, 2003; Michalski *et al.*, 2005; Michalski *et al.*, 2007b], la diversa dimensione di questi potrebbe esser legata ad alcune differenze a livello delle proprietà chimico-fisiche e della composizione in acidi grassi del latte e di conseguenza potrebbero essere utilizzate per la produzione dei prodotti lattiero-caseari.

5.3. MATERIALI E METODI

5.3.1 Selezione delle bovine Reggiane e raccolta dei campioni di latte dagli allevamenti.

Il presente studio è stato effettuato all'interno di due allevamenti di bovine da latte di razza Reggiana, collocati vicini e all'interno del comprensorio di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano in provincia di Reggio Emilia, a conduzione da considerare sostanzialmente omogenea a livello di management aziendale, in particolare per quanto riguarda il razionamento alimentare. Più in dettaglio, nell'ambito dei citati allevamenti, la razione alimentare di base delle bovine, riportata nella Tabella 14, è risultata uguale e impostata in conformità alle norme del disciplinare del Consorzio del Parmigiano Reggiano ed ha seguito il normale condizionamento collegato all'andamento stagionale, caratterizzato dal largo impiego dei foraggi di erba medica e di prato polifita, somministrati allo stato fresco o essiccato.

Tabella 14. Razione alimentare delle bovine di latte in funzione del periodo stagionale.

Periodo	Razione alimentare
Dicembre- Marzo	Foraggi essiccati (fieno + MCI*)
Aprile - Novembre	Foraggi verdi (40% di erba medica e 60% di prato polifita) + MCI*

*MCI: mangime composto integrato (1Kg 3L⁻¹ latte)

Nei due allevamenti sono state identificate 55 bovine da latte di razza Reggiana con ordine di parto tra il 2° e il 5° parto (Tabella 15) e con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg. Lo stadio di lattazione è stato ricostruito per ciascuna bovina nei due allevamenti in funzione della data-parto. Dalle stesse a parità di epoca di lattazione e nell'arco di quest'ultima, sono stati effettuati tre campionamenti di latte per singola bovina per un totale di 165 campioni, raccolti in tre fasi della lattazione (inizio lattazione = circa 60 giorni dopo il parto; metà lattazione = circa 120 giorni dopo il parto; fine lattazione = circa 180 giorni dopo il parto), in modo tale da ridurre l'influenza di alcuni effetti legati alla curva di lattazione, alle variazioni stagionali e alla diversa razione alimentare, che possono influire sulla composizione del latte e nella fattispecie sulle proprietà chimico-fisiche del grasso.

Tabella 15. Distribuzione dei fenotipi della κ -caseina e della β -lattoglobulina tra le bovine di razza Reggiana.

Fenotipo κ -caseina	Fenotipo β -lattoglobulina			Totale
	AA	AB	BB	
AA	3 ^a	5		8
AB	10	9	8	27
BB	6	8	6	20
Totale	19	22	14	55

^a Numero delle bovine

5.3.2. Caratterizzazione del polimorfismo genetico proteico del latte bovino.

Il polimorfismo genetico delle proteine, in particolare della κ -Cn e della β -Lg delle bovine degli allevamenti citati è stato ottenuto in collaborazione con l'APA (Associazione Provinciale Allevatori), la cui metodica di identificazione delle varianti genetiche delle proteine del latte mediante elettroforesi, fa riferimento allo studio di Davoli [1981].

5.3.3. Trattamento dei campioni.

I campioni di latte individuale, previa agitazione, sono stati prelevati in doppio in appositi contenitori del volume di 150 mL durante la mungitura della sera e sono stati conservati a 2-4°C per 24 h fino al momento dell'effettuazione delle analisi.

5.3.4. Determinazione della composizione macroscopica dei campioni di latte.

I campioni di latte sono stati analizzati per rilevare la composizione macroscopica del latte, insieme ad altri parametri con le rispettive metodiche di seguito indicate.

Il contenuto in caseina e grasso è stato determinato con Milkoscan FT-IR120 (Foss Analytical A/S, Hilleroed, Denmark); la rilevazione del pH è stata effettuata con pHmetro Orion ad una temperatura di 20°C; l'acidità titolabile ottenuta per titolazione di 50 mL di latte con NaOH 0,25 mol L⁻¹ in presenza di fenoftaleina è stata espressa in °SH (Soxhlet-Henkel); infine il conteggio delle cellule somatiche è stato eseguito con metodo fluoroptoelettronico mediante Fossomatic [Schmidt, 1975].

5.3.5. Determinazione della composizione in acidi grassi dei campioni di latte.

L'estrazione del grasso del latte, da 165 campioni individuali di latte, è stata eseguita in doppio utilizzando il metodo Röse-Gottlieb [AOAC, 1990] e il profilo in acidi grassi dei campioni di latte è stato determinato mediante l'analisi degli esteri metilici degli acidi

grassi (FAME), previa trans-metilazione, utilizzando KOH in metanolo (2 mol L^{-1}), come descritto da Christie [Christie, 1998].

La determinazione della composizione in acidi grassi è stata eseguita con un gascromatografo Perkin Elmer, modello Clarus 500, fornito di una colonna capillare Restek 2330 ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.} \times 0,2 \text{ } \mu\text{m}$, cianopropilica), un detector a ionizzazione di fiamma (FID) ed un autocampionatore. Il detector FID è stato mantenuto a 250°C con un flusso di aria di 400 mL min^{-1} e un flusso di idrogeno di 40 mL min^{-1} . L'iniettore è stato mantenuto a 250°C con un rapporto di splittaggio 1:20. E' stato iniettato un volume di $1 \text{ } \mu\text{L}$. La temperatura della colonna è stata programmata come segue: da 40°C a 160°C a $12^\circ\text{C min}^{-1}$, da 160°C a 200°C a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ ed infine, da 200°C a 240°C a $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Il tempo totale della corsa cromatografica è risultato di 23 minuti. Il metil-pelargonato (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stato usato come standard interno (C_9 methyl-pelargonate, 1 mg mL^{-1}).

5.3.6. Analisi statistica.

I dati ottenuti relativi alla composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana sono stati elaborati mediante analisi della varianza multivariata, utilizzando un test del modello lineare generale (GLM), eseguito con il pacchetto statistico SPSS per Windows, versione 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Il test di Tukey HSD è stato impiegato per confrontare le medie dei campioni di latte e le valutazioni sono state basate su un livello di significatività del 5% ($p < 0,05$).

5.3.7 Selezione delle bovine di razza Reggiana e Frisona e raccolta dei campioni di latte.

La seconda parte di questa ricerca è stata effettuata inizialmente in un allevamento di bovine da latte di razza Reggiana e Frisona, situato all'interno del comprensorio di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano in provincia di Reggio Emilia.

In particolare si è proceduto al prelevamento di singoli campioni di latte di massa in appositi contenitori del volume di 150 mL durante la mungitura della sera e alla conservazione a 2-4°C per 24 h fino al momento dell'effettuazione delle analisi.

Successivamente sono state identificate 12 bovine da latte di sola razza Reggiana con differente fenotipo per κ -Cn, in un allevamento situato all'interno del comprensorio di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano in provincia di Reggio Emilia, con ordine di parto tra il 2° e il 6° parto e al 4° mese di lattazione.

I campioni di latte individuale, previa agitazione, sono stati prelevati in appositi contenitori del volume di 150 mL durante la mungitura della sera e conservati a 2-4°C per 24 h fino al momento dell'effettuazione delle analisi.

5.3.8. Determinazione e analisi della dimensione dei globuli di grasso.

L'analisi dei campioni di latte di massa ed individuali di bovine da latte di razza Reggiana e Frisone è stata effettuata secondo il metodo di Cecchi *et al.* [2005], al fine di determinare le dimensioni dei globuli di grasso. In particolare, quest'ultimi sono stati marcati con una soluzione di arancio di acridina 0,1% in tampone fosfato (0,1 mol/ L, pH 6,8).

L'acquisizione e la elaborazione dell'immagine (40 immagini 60x per un totale di circa 1000 globuli per ogni campione) sono state eseguite utilizzando un microscopio a fluorescenza (NIKON ECLIPSE modello TE 2002-E) con un kit ottico per la fluorescenza, equipaggiato con il software NIS-Elements AR 2.20 per l'acquisizione ed analisi dell'immagine.

L'analisi statistica è stata realizzata mediante l'analisi della varianza (ANOVA), eseguita con il pacchetto per Windows Stat Soft (Tulsa, OK, USA), versione 6.

5.4. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.4.1 Analisi della composizione macroscopica del latte con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg.

I dati e le osservazioni delle analisi chimico-fisiche complessivamente raccolte nel corso della lattazione delle singole bovine seguite durante la sperimentazione, sono riportati nelle Tabelle 16 – 23. Nelle Tabelle 16 e 17 ritroviamo i valori medi dei dati relativi ad alcune componenti della composizione macroscopica del latte, agli indici chimico-fisici e al contenuto in cellule somatiche registrati nell'arco dell'intera lattazione delle bovine con differenti fenotipi per κ -Cn e per β -Lg, noti per ogni singola bovina. La valutazione dei risultati di queste analisi non permette di riscontrare delle differenze sostanziali all'interno dei diversi fenotipi del latte delle bovine prese in esame, sia per κ -Cn in accordo con Schaar *et al.* [1985] e Macheboeuf *et al.* [1993], che per β -Lg [Strzalkowska *et al.*, 2002] ed inoltre essi non si discostano, in modo rilevante, dai dati rilevabili in tesi generale in letteratura relativi a detti parametri.

Tabella 16. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (valori medi \pm D.S., n=165 campioni).

Fenotipo κ -Cn	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	23,16 \pm 5,88	22,76 \pm 4,77	23,28 \pm 5,46
pH	6,71 \pm 0,03	6,72 \pm 0,01	6,71 \pm 0,02
Acidità titolabile °SH 50 mL ⁻¹	3,19 \pm 0,09	3,34 \pm 0,03	3,35 \pm 0,04
Caseina g 100g ⁻¹	2,60 \pm 0,32	2,67 \pm 0,21	2,68 \pm 0,28
Grasso g 100g ⁻¹	3,81 \pm 0,12	3,66 \pm 0,15	3,82 \pm 0,13
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	155,97 \pm 27,55	123,85 \pm 16,86	135,83 \pm 29,90

AA = 8 bovine; AB = 27 bovine; BB = 20 bovine

Tabella 17. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg (valori medi \pm D.S., n=165 campioni).

Fenotipo β -Lg	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	21,26 \pm 5,96	23,64 \pm 4,56	23,12 \pm 5,80
pH	6,71 \pm 0,03	6,72 \pm 0,01	6,69 \pm 0,01
Acidità titolabile °SH 50 mL ⁻¹	3,37 \pm 0,04	3,28 \pm 0,06	3,43 \pm 0,06
Caseina g 100g ⁻¹	2,70 \pm 0,28	2,65 \pm 0,26	2,62 \pm 0,21
Grasso g 100g ⁻¹	3,90 \pm 0,09	3,74 \pm 0,19	3,53 \pm 0,22
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	159,23 \pm 59,09	109,34 \pm 19,19	147,51 \pm 40,43

AA = 19 bovine; AB = 22 bovine; BB = 14 bovine

Inoltre, i risultati delle analisi chimico-fisiche sono stati suddivisi per le tre fasi principali della lattazione delle bovine.

Come si può osservare nelle Tabelle 18, 19 e 20 nel latte delle bovine con fenotipo per κ -Cn, oltre al normale andamento dei costituenti del latte durante la lattazione (aumento fisiologico del contenuto percentuale in caseina e in grasso), è stato notato un aumento della percentuale di caseina e di grasso nel latte delle bovine con la variante B per κ -Cn rispetto al latte delle bovine con la variante A.

Tabella 18. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (Inizio lattazione = circa 60 giorni dopo il parto).

Fenotipo κ -Cn	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	29,06	28,10	28,94
pH	6,69	6,71	6,69
Acidità titolabile °SH 50 mL ⁻¹	3,25	3,36	3,34
Caseina g 100g ⁻¹	2,31	2,48	2,43
Grasso g 100g ⁻¹	3,67	3,49	3,71
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	183,80	106,35	114,11

Tabella 19. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (Metà lattazione = circa 120 giorni dopo il parto).

Fenotipo κ -Cn	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	23,16	21,22	22,86
pH	6,70	6,72	6,71
Acidità titolabile °SH 50 mL ⁻¹	3,23	3,31	3,32
Caseina g 100g ⁻¹	2,53	2,62	2,61
Grasso g 100g ⁻¹	3,89	3,71	3,77
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	128,70	125,23	123,44

Tabella 20. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (Fine lattazione = circa 180 giorni dopo il parto).

Fenotipo κ -Cn	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	17,30	18,94	18,04
pH	6,74	6,72	6,72
Acidità titolabile °SH 50 mL ⁻¹	3,09	3,36	3,40
Caseina g 100g ⁻¹	2,95	2,90	2,99
Grasso g 100g ⁻¹	3,88	3,78	3,97
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	155,41	139,97	169,94

Lo stesso tipo di valutazione, relativamente ai tre periodi della lattazione individuati, è stata realizzata anche per i campioni di latte delle bovine con fenotipo per β -Lg (Tab. 21, 22, 23), ma in questo caso non è stato rilevato lo stesso andamento per la variante B rispetto alla variante A della β -Lg.

Tabella 21. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg (Inizio lattazione = circa 60 giorni dopo il parto).

Fenotipo β -Lg	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	27,74	28,28	29,66
pH	6,68	6,72	6,68
Acidità titolabile °SH 50 mL ⁻¹	3,42	3,21	3,47
Caseina g 100g ⁻¹	2,45	2,44	2,43
Grasso g 100g ⁻¹	3,80	3,55	3,28
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	99,41	100,79	192,90

Tabella 22. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg (Metà lattazione = circa 120 giorni dopo il parto).

Fenotipo β -Lg	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	20,02	23,46	21,14
pH	6,72	6,72	6,69
Acidità titolabile °SH 50 mL ⁻¹	3,33	3,31	3,36
Caseina g 100g ⁻¹	2,66	2,58	2,60
Grasso g 100g ⁻¹	3,93	3,74	3,62
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	160,71	95,91	134,30

Tabella 23. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg (Fine lattazione = circa 180 giorni dopo il parto).

Fenotipo β -Lg	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	16,02	19,16	18,58
pH	6,74	6,73	6,69
Acidità titolabile °SH 50 mL ⁻¹	3,37	3,30	3,44
Caseina g 100g ⁻¹	3,00	2,94	2,85
Grasso g 100g ⁻¹	3,97	3,93	3,69
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	217,57	131,32	115,33

5.4.2 Analisi della composizione in acidi grassi del latte con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg.

Nelle Tabelle 24 e 28 sono riportati i valori medi dei dati relativi alla composizione in acidi grassi dei campioni di latte analizzati con diverso fenotipo per κ -Cn e per β -Lg. Nella Figura 16 è illustrato un cromatogramma “tipo” relativo ad un campione di latte di razza Reggiana, nel quale risultano ben evidenziati i principali acidi grassi considerati nel corso del presente studio. Come si può notare, in questa ricerca sono stati identificati undici maggiori acidi grassi presenti nel latte bovino, in quanto lo scopo della ricerca è stato quello di confermare i risultati ottenuti da Bobe *et al.* [2004]. E’ stata inoltre considerata la somma degli acidi grassi da C_{6:0} a C_{14:0} come indicatore della sintesi *de novo* degli acidi grassi nella ghiandola mammaria, al fine di evidenziare maggiormente le differenze tra i diversi fenotipi per κ -Cn e per β -Lg [Ferlay *et al.*, 2008].

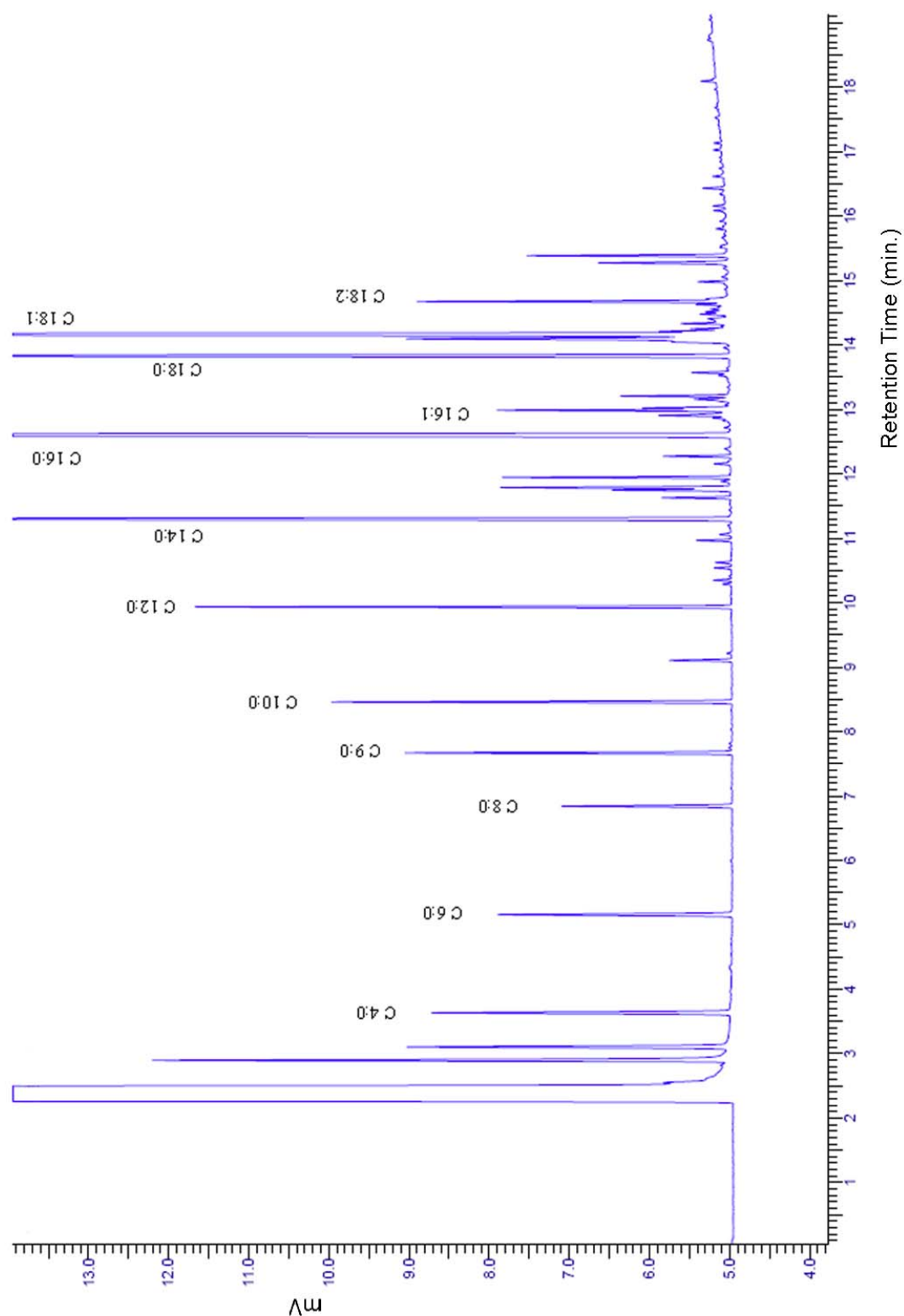


Figura 16. Profilo gas-cromatografico degli acidi grassi di un campione di latte di razza Reggiana (C_{9:0} = standard interno).

A seguito di un'accurata analisi statistica sono state verificate delle associazioni statisticamente significative tra la variazione di alcuni acidi grassi e il polimorfismo genetico per κ -Cn e per β -Lg. In particolare è possibile notare come la composizione in acidi grassi sembra essere influenzata dai fenotipi per κ -Cn, in quanto nel grasso del latte delle bovine con la variante B è stata riscontrata un'elevata concentrazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) di acido caprico ($C_{10:0}$), di acido laurico ($C_{12:0}$) e di acido miristico ($C_{14:0}$) e contemporaneamente una ridotta concentrazione di acido stearico ($C_{18:0}$) e di acido oleico ($C_{18:1}$) rispetto alla composizione in acidi grassi del grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A (Tab. 24).

Tabella 24. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (valori medi \pm D.S., $n=165$ campioni).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
$C_{4:0}$	$2,02 \pm 0,41$	$2,04 \pm 0,5$	$1,99 \pm 0,47$
$C_{6:0}$	$1,39 \pm 0,21$	$1,42 \pm 0,21$	$1,42 \pm 0,21$
$C_{8:0}$	$0,96 \pm 0,2$	$1,00 \pm 0,18$	$1,02 \pm 0,17$
$C_{10:0}$	$2,29^a \pm 0,61$	$2,53^b \pm 0,67$	$2,59^b \pm 0,55$
$C_{12:0}$	$2,77^a \pm 0,73$	$3,17^b \pm 1,05$	$3,20^b \pm 0,72$
$C_{14:0}$	$9,22^a \pm 1,87$	$10,25^b \pm 2,44$	$10,27^b \pm 2,01$
$C_{16:0}$	$21,16 \pm 3,76$	$22,76 \pm 6,57$	$22,15 \pm 4,58$
$C_{16:1}$	$1,62 \pm 0,47$	$1,55 \pm 0,47$	$1,59 \pm 0,42$
$C_{18:0}$	$7,84^b \pm 2,57$	$7,20^{a,b} \pm 2,48$	$6,94^a \pm 2,02$
$C_{18:1}$	$19,19^b \pm 7,31$	$16,81^a \pm 4,79$	$16,79^a \pm 4,29$
$C_{18:2}$	$2,49 \pm 0,77$	$2,60 \pm 0,70$	$2,49 \pm 0,68$
Somma $C_{6:0}$ - $C_{14:0}$	$16,62^a \pm 3,37$	$18,37^b \pm 3,78$	$18,49^b \pm 3,78$

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

AA = 8 bovine; AB = 27 bovine; BB = 20 bovine

Pertanto le maggiori proporzioni di acido laurico e miristico potrebbero far presupporre che la κ -Cn omozigote per B possa essere associata positivamente con l'aumento della sintesi *de novo* degli acidi grassi a livello della ghiandola mammaria, in accordo con i risultati di Bober *et al.* [2004]. Infatti, se si considera la somma degli acidi grassi da $C_{6:0}$ a

C_{14:0} ($p<0.05$) nel grasso del latte delle bovine con la variante B, quest'ultima presenta una concentrazione maggiore statisticamente significativa, rispetto a quella del grasso del latte delle bovine caratterizzata dalla variante A. Anche κ -Cn AB sembra avere lo stesso effetto.

Inoltre, i valori medi dei dati relativi alla composizione in acidi grassi dei campioni di latte analizzati con diverso fenotipo per κ -Cn sono stati suddivisi per le tre fasi principali della lattazione delle bovine (Tab. 25, 26, 27). Dalla valutazione di quest'ultimi dati, in particolar modo, elevate proporzioni da C_{8:0} a C_{14:0} nel grasso del latte delle bovine con κ -Cn AB e BB *vs* κ -Cn AA sono state statisticamente significative ($p<0.05$) a 60 e 180 giorni, ma non a 120 giorni dopo il parto. Contemporaneamente ridotte concentrazioni di acido stearico (C_{18:0}) e di acido oleico (C_{18:1}) sono risultate statisticamente significative ($p<0.05$) solo a 60 giorni dopo il parto nel grasso del latte delle bovine con κ -Cn AB e BB *vs* κ -Cn AA.

Tabella 25. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (**Inizio lattazione** = circa 60 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	2,22 ^a \pm 0,41	2,21 ^a \pm 0,53	2,15 ^a \pm 0,47
C _{6:0}	1,38 ^a \pm 0,19	1,54 ^b \pm 0,22	1,47 ^{a,b} \pm 0,15
C _{8:0}	0,92 ^a \pm 0,18	1,09 ^b \pm 0,19	1,05 ^b \pm 0,14
C _{10:0}	2,09 ^a \pm 0,48	2,68 ^b \pm 0,71	2,61 ^b \pm 0,48
C _{12:0}	2,51 ^a \pm 0,56	3,22 ^b \pm 1,04	3,17 ^b \pm 0,65
C _{14:0}	8,62 ^a \pm 1,49	9,99 ^b \pm 2,54	10,2 ^b \pm 2,21
C _{16:0}	22,13 ^a \pm 4,5	21,64 ^a \pm 5,17	22,46 ^a \pm 5,28
C _{16:1}	1,67 ^a \pm 0,62	1,50 ^a \pm 0,41	1,51 ^a \pm 0,39
C _{18:0}	9,33 ^b \pm 2,59	8,42 ^{a,b} \pm 2,83	7,80 ^a \pm 2,21
C _{18:1}	22,91 ^b \pm 9,01	17,58 ^a \pm 5,23	17,92 ^a \pm 4,68
C _{18:2}	2,72 ^a \pm 0,61	2,80 ^a \pm 0,82	2,73 ^a \pm 0,77

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p<0,05$

Tabella 26. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (**Metà lattazione** = circa 120 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,99 ^a \pm 0,37	2,03 ^a \pm 0,49	1,96 ^a \pm 0,49
C _{6:0}	1,48 ^a \pm 0,21	1,38 ^a \pm 0,18	1,43 ^a \pm 0,27
C _{8:0}	1,09 ^a \pm 0,19	0,99 ^a \pm 0,14	1,03 ^a \pm 0,22
C _{10:0}	2,73 ^a \pm 0,6	2,57 ^a \pm 0,64	2,67 ^a \pm 0,67
C _{12:0}	3,32 ^a \pm 0,73	3,32 ^a \pm 1,17	3,31 ^a \pm 0,85
C _{14:0}	10,50 ^a \pm 1,98	10,88 ^a \pm 2,37	10,55 ^a \pm 2,09
C _{16:0}	21,03 ^a \pm 3,29	25,04 ^b \pm 8,07	22,45 ^{a,b} \pm 4,98
C _{16:1}	1,48 ^a \pm 0,36	1,53 ^a \pm 0,54	1,55 ^a \pm 0,45
C _{18:0}	7,12 ^a \pm 2,42	7,12 ^a \pm 2,32	6,56 ^a \pm 1,84
C _{18:1}	16,64 ^a \pm 5,18	16,65 ^a \pm 4,97	15,88 ^a \pm 4,54
C _{18:2}	2,40 ^a \pm 1,01	2,56 ^a \pm 0,67	2,37 ^a \pm 0,67

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 27. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (**Fine lattazione** = circa 180 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,66 ^a \pm 0,20	1,89 ^a \pm 0,43	1,80 ^a \pm 0,35
C _{6:0}	1,25 ^a \pm 0,17	1,34 ^a \pm 0,17	1,32 ^a \pm 0,19
C _{8:0}	0,83 ^a \pm 0,13	0,93 ^{a,b} \pm 0,17	0,95 ^b \pm 0,14
C _{10:0}	1,93 ^a \pm 0,36	2,33 ^b \pm 0,61	2,44 ^b \pm 0,46
C _{12:0}	2,36 ^a \pm 0,41	2,90 ^b \pm 0,83	3,09 ^b \pm 0,62
C _{14:0}	8,21 ^a \pm 1,05	9,64 ^b \pm 2,26	10,01 ^b \pm 1,5
C _{16:0}	19,53 ^a \pm 2,29	20,75 ^a \pm 4,31	21,27 ^a \pm 2,32
C _{16:1}	1,79 ^a \pm 0,17	1,64 ^a \pm 0,41	1,79 ^a \pm 0,36
C _{18:0}	6,19 ^a \pm 0,52	6,04 ^a \pm 1,58	6,04 ^a \pm 1,27
C _{18:1}	16,29 ^a \pm 1,89	16,24 ^a \pm 3,96	16,16 ^a \pm 2,75
C _{18:2}	2,23 ^a \pm 0,48	2,44 ^a \pm 0,55	2,28 ^a \pm 0,40

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Contemporaneamente, la composizione in acidi grassi del latte non sembra essere influenzata dai fenotipi della β -Lg, in quanto il grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per B presenta concentrazioni statisticamente significative ($p < 0,05$) di acido laurico ($C_{12:0}$) ed una quantità rilevante, ma non statisticamente significativa di acido miristico ($C_{14:0}$) e palmitico ($C_{16:0}$) rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A. Concentrazioni minori ($p < 0,05$) di acido stearico ($C_{18:0}$) e acido oleico ($C_{18:1}$) sono state riscontrate nel grasso del latte delle bovine con la variante A e B rispetto a quella del grasso del latte delle bovine con la variante AB (Tab. 28).

Tabella 28. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg (valori medi \pm D.S., $n=165$ campioni).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
$C_{4:0}$	$1,97 \pm 0,43$	$2,05 \pm 0,52$	$2,06 \pm 0,48$
$C_{6:0}$	$1,39 \pm 0,21$	$1,42 \pm 0,21$	$1,42 \pm 0,2$
$C_{8:0}$	$0,99 \pm 0,18$	$0,99 \pm 0,18$	$1,03 \pm 0,18$
$C_{10:0}$	$2,47 \pm 0,59$	$2,47 \pm 0,58$	$2,65 \pm 0,71$
$C_{12:0}$	$3,05^a \pm 0,82$	$3,04^a \pm 0,75$	$3,33^b \pm 1,20$
$C_{14:0}$	$9,85 \pm 2,27$	$10,18 \pm 2,10$	$10,35 \pm 2,43$
$C_{16:0}$	$21,72 \pm 5,06$	$22,90 \pm 4,81$	$22,28 \pm 7,31$
$C_{16:1}$	$1,59 \pm 0,44$	$1,56 \pm 0,39$	$1,59 \pm 0,55$
$C_{18:0}$	$6,93^a \pm 1,81$	$7,86^b \pm 2,81$	$6,59^a \pm 2,04$
$C_{18:1}$	$16,74^{a,b} \pm 4,27$	$18,24^b \pm 5,95$	$16,07^a \pm 4,65$
$C_{18:2}$	$2,50 \pm 0,67$	$2,65 \pm 0,81$	$2,46 \pm 0,56$
Somma $C_{6:0}$ - $C_{14:0}$	$17,76 \pm 3,62$	$18,10 \pm 3,76$	$18,78 \pm 3,80$

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

AA = 19 bovine; AB = 22 bovine; BB = 14 bovine

Anche in questo caso, le maggiori proporzioni di acido laurico, miristico e palmitico potrebbero far presupporre che la β -Lg omozigote per B possa essere associata positivamente con l'aumento della sintesi *de novo* degli acidi grassi a livello della ghiandola mammaria, sempre in accordo con i risultati di Bobe *et al.* [2004]. Infatti, la

somma degli acidi grassi da C_{6:0} a C_{14:0} nel grasso del latte delle bovine con la variante B presenta una concentrazione maggiore, ma non statisticamente significativa, rispetto a quella del grasso del latte delle bovine con la variante A.

Inoltre i valori medi dei dati relativi alla composizione in acidi grassi dei campioni di latte analizzati con diverso fenotipo per β -Lg sono stati suddivisi per le tre fasi principali della lattazione delle bovine (Tab. 29, 30, 31). Dalla valutazione di quest'ultimi dati, è emerso che elevate proporzioni di acido palmitico (C_{16:0}), di acido stearico (C_{18:0}) e acido oleico (C_{18:1}) nel grasso del latte delle bovine con β -Lg AB vs β -Lg AA e BB risultano statisticamente significative ($p < 0.05$) solo a 60 giorni dopo il parto. Le elevate concentrazioni di acido caprico (C_{10:0}), acido laurico (C_{12:0}), di acido miristico (C_{14:0}), e di acido palmitico (C_{16:0}) nel grasso del latte delle bovine con β -Lg BB vs β -Lg AA sono risultate statisticamente significative ($p < 0.05$) solo a 120 giorni dopo il parto.

Tabella 29. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg (**Inizio lattazione** = circa 60 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	2,15 ^a \pm 0,45	2,21 ^a \pm 0,54	2,21 ^a \pm 0,45
C _{6:0}	1,46 ^a \pm 0,22	1,49 ^a \pm 0,20	1,52 ^a \pm 0,14
C _{8:0}	1,04 ^a \pm 0,19	1,02 ^a \pm 0,18	1,09 ^a \pm 0,16
C _{10:0}	2,58 ^a \pm 0,7	2,48 ^a \pm 0,55	2,63 ^a \pm 0,64
C _{12:0}	3,15 ^a \pm 1,04	3,01 ^a \pm 0,71	3,07 ^a \pm 0,81
C _{14:0}	9,75 ^a \pm 2,65	10,22 ^a \pm 2,22	9,27 ^a \pm 1,77
C _{16:0}	21,93 ^b \pm 5,55	23,83 ^b \pm 4,93	18,90 ^a \pm 2,33
C _{16:1}	1,55 ^a \pm 0,44	1,55 ^a \pm 0,50	1,46 ^a \pm 0,36
C _{18:0}	7,63 ^a \pm 1,93	9,35 ^b \pm 2,97	7,69 ^a \pm 2,32
C _{18:1}	17,03 ^a \pm 4,91	20,99 ^b \pm 7,01	17,01 ^a \pm 4,97
C _{18:2}	2,57 ^a \pm 0,73	3,02 ^b \pm 0,84	2,61 ^a \pm 0,5

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 30. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg (**Metà lattazione** = circa 120 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,88 ^a \pm 0,36	2,04 ^a \pm 0,51	2,08 ^a \pm 0,52
C _{6:0}	1,39 ^a \pm 0,22	1,42 ^a \pm 0,21	1,42 ^a \pm 0,21
C _{8:0}	0,99 ^a \pm 0,18	1,02 ^a \pm 0,18	1,05 ^a \pm 0,16
C _{10:0}	2,45 ^a \pm 0,51	2,59 ^{a,b} \pm 0,6	2,86 ^b \pm 0,75
C _{12:0}	3,00 ^a \pm 0,57	3,23 ^a \pm 0,79	3,79 ^b \pm 1,47
C _{14:0}	9,90 ^a \pm 1,85	10,77 ^{a,b} \pm 2,06	11,61 ^b \pm 2,52
C _{16:0}	21,76 ^a \pm 4,76	23,6 ^{a,b} \pm 5,36	26,04 ^b \pm 9,73
C _{16:1}	1,51 ^a \pm 0,45	1,49 ^a \pm 0,29	1,59 ^a \pm 0,71
C _{18:0}	7,08 ^{a,b} \pm 1,66	7,47 ^b \pm 2,65	6,12 ^a \pm 1,85
C _{18:1}	16,64 ^a \pm 4,3	17,16 ^a \pm 5,23	15,17 ^a \pm 4,77
C _{18:2}	2,46 ^a \pm 0,69	2,54 ^a \pm 0,82	2,42 ^a \pm 0,65

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 31. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg (**Fine lattazione** = circa 180 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,82 ^a \pm 0,39	1,83 ^a \pm 0,42	1,86 ^a \pm 0,36
C _{6:0}	1,32 ^a \pm 0,14	1,33 ^a \pm 0,20	1,31 ^a \pm 0,19
C _{8:0}	0,93 ^a \pm 0,13	0,92 ^a \pm 0,18	0,94 ^a \pm 0,18
C _{10:0}	2,35 ^a \pm 0,50	2,26 ^a \pm 0,56	2,36 ^a \pm 0,65
C _{12:0}	2,99 ^a \pm 0,76	2,78 ^a \pm 0,67	2,92 ^a \pm 0,86
C _{14:0}	9,92 ^a \pm 2,23	9,23 ^a \pm 1,64	9,61 ^a \pm 2,07
C _{16:0}	21,38 ^a \pm 4,84	20,49 ^a \pm 2,52	20,27 ^a \pm 2,61
C _{16:1}	1,73 ^a \pm 0,41	1,66 ^a \pm 0,32	1,74 ^a \pm 0,40
C _{18:0}	5,84 ^a \pm 1,25	6,27 ^a \pm 1,47	6,06 ^a \pm 1,48
C _{18:1}	16,49 ^a \pm 3,30	15,81 ^a \pm 3,12	16,42 ^a \pm 3,95
C _{18:2}	2,45 ^a \pm 0,57	2,26 ^a \pm 0,45	2,37 ^a \pm 0,47

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tali dati confermano i risultati ottenuti nello studio effettuato da Bobe *et al.* [2004], nel quale sono stati considerati gli stessi acidi grassi presi in considerazione nel corso della nostra ricerca sperimentale. Nello specifico, i nostri dati confermano l'andamento degli acidi grassi in relazione al polimorfismo genetico per κ -Cn. Al contrario, l'andamento seguito dagli acidi grassi in relazione al fenotipo per β -Lg, pur con qualche lieve differenza, non è risultato comunque statisticamente significativo e di conseguenza non ha confermato i risultati raggiunti dagli Autori sopracitati. Sempre in riferimento al fenotipo per β -Lg, anche alcuni studi effettuati in Nuova Zelanda, non hanno rilevato una associazione tra il fenotipo per β -Lg e la composizione in acidi grassi del latte bovino [MacGibbon *et al.*, 1997; Mackle *et al.*, 1999]. In particolare i risultati di questi studi suggeriscono che i cambiamenti nella composizione in acidi grassi, dovuti alla composizione della dieta o alle tecniche di selezione delle bovine da latte, potrebbero spiegare le differenze evidenziate negli studi eseguiti in Nuova Zelanda [Bobe *et al.*, 2004; Mackle *et al.*, 1999].

Saranno necessari pertanto, ulteriori studi per raggiungere una conclusione definitiva e per verificare se la composizione in acidi grassi del latte bovino può essere influenzata da tutti o solo da alcuni polimorfismi genetici delle proteine del latte.

Osservando la percentuale di acido oleico presente nei campioni di latte (Tab. 24 e 28) emerge inoltre che, la presenza di tale acido è notevolmente inferiore rispetto a quella rilevata nei dati riscontrabili in letteratura, in quanto come è noto, esso rappresenta tra gli acidi grassi insaturi quello presente in maggiori proporzioni [Malacarne *et al.*, 2001; Lucas *et al.*, 2006]. Una logica spiegazione per un tale rilevato andamento potrebbe essere collegata al livello energetico della razione di base delle bovine, che può influire oltre che sulla quantità di grasso prodotta, anche sulla composizione dei lipidi [Corradini, 1995].

Inoltre tutto ciò potrebbe essere messo in relazione alla diversa origine degli acidi grassi del latte. Di conseguenza si può dedurre che i componenti lipidici della dieta possono influire direttamente sulla composizione del grasso, mentre il livello energetico della razione può modificare le attività fermentative ruminali che determinano la disponibilità di precursori per la sintesi del grasso e la secrezione degli ormoni che regolano il metabolismo lipidico.

5.4.3 Analisi della composizione in acidi grassi del latte con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg nei due allevamenti selezionati.

Nelle Tabelle 32-47 sono riportati i valori medi dei dati relativi alla composizione in acidi grassi dei campioni di latte analizzati con diverso fenotipo per κ -Cn e per β -Lg, considerando separatamente i valori medi dei dati dei campioni prelevati nei due allevamenti durante l'intero arco della lattazione delle bovine.

Come si può notare nell'allevamento n° 1, i valori medi dei dati relativi alla composizione in acidi grassi dei campioni di latte analizzati con diverso fenotipo per κ -Cn sono stati suddivisi per le tre fasi principali della lattazione delle bovine (Tab. 32, 33, 34), mentre nella Tabella 35 sono stati riportati i dati relativi all'intera lattazione delle bovine con fenotipo per κ -Cn.

Dalla valutazione statistica dei dati si rileva, in particolar modo all'inizio e durante l'intera lattazione, un'elevata concentrazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) di acido caprico ($C_{10:0}$), di acido laurico ($C_{12:0}$) e di acido miristico ($C_{14:0}$) e contemporaneamente una ridotta concentrazione di acido stearico ($C_{18:0}$) e di acido oleico ($C_{18:1}$) nel grasso del latte delle bovine con la variante B rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A. Nella fase finale della lattazione è stata comunque riscontrata una concentrazione elevata ma non statisticamente significativa di acido caprico ($C_{10:0}$), di acido laurico ($C_{12:0}$) e di acido miristico ($C_{14:0}$) e contemporaneamente una ridotta concentrazione di acido stearico ($C_{18:0}$) nel grasso del latte delle bovine con la variante B rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A.

Tabella 32. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn nell'allevamento n.º1 (Inizio lattazione = circa 60 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	2,25 ^a \pm 0,46	2,11 ^a \pm 0,58	2,15 ^a \pm 0,55
C _{6:0}	1,30 ^a \pm 0,13	1,53 ^b \pm 0,16	1,48 ^b \pm 0,13
C _{8:0}	0,84 ^a \pm 0,13	1,06 ^b \pm 0,16	1,03 ^b \pm 0,10
C _{10:0}	1,89 ^a \pm 0,36	2,59 ^b \pm 0,69	2,55 ^b \pm 0,29
C _{12:0}	2,31 ^a \pm 0,47	3,20 ^b \pm 1,11	3,17 ^b \pm 0,46
C _{14:0}	8,18 ^a \pm 1,39	10,06 ^b \pm 2,62	10,60 ^b \pm 2,00
C _{16:0}	22,85 ^a \pm 4,92	22,64 ^a \pm 5,84	24,57 ^a \pm 5,61
C _{16:1}	1,70 ^a \pm 0,68	1,63 ^a \pm 0,43	1,42 ^a \pm 0,37
C _{18:0}	10,08 ^a \pm 2,6	8,67 ^a \pm 2,54	8,51 ^a \pm 2,42
C _{18:1}	25,55 ^b \pm 8,97	19,22 ^a \pm 5,39	19,43 ^a \pm 4,84
C _{18:2}	2,79 ^a \pm 0,68	2,95 ^a \pm 0,74	3,05 ^a \pm 0,81

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 33. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn nell'allevamento n.º1 (Metà lattazione = circa 120 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	2,03 ^a \pm 0,46	2,04 ^a \pm 0,55	1,99 ^a \pm 0,56
C _{6:0}	1,50 ^a \pm 0,21	1,39 ^a \pm 0,21	1,47 ^a \pm 0,29
C _{8:0}	1,04 ^a \pm 0,20	0,98 ^a \pm 0,16	1,02 ^a \pm 0,20
C _{10:0}	2,59 ^a \pm 0,68	2,56 ^a \pm 0,73	2,51 ^a \pm 0,57
C _{12:0}	3,17 ^a \pm 0,91	3,47 ^a \pm 1,43	3,15 ^a \pm 0,71
C _{14:0}	10,24 ^a \pm 2,51	11,71 ^a \pm 2,55	10,64 ^a \pm 2,18
C _{16:0}	22,20 ^a \pm 3,85	28,73 ^b \pm 8,57	25,15 ^{a,b} \pm 6,15
C _{16:1}	1,70 ^a \pm 0,21	1,72 ^a \pm 0,54	1,69 ^a \pm 0,42
C _{18:0}	8,99 ^a \pm 1,55	7,89 ^a \pm 2,58	7,49 ^a \pm 2,29
C _{18:1}	20,38 ^a \pm 3,70	19,01 ^a \pm 4,74	18,25 ^a \pm 4,7
C _{18:2}	3,02 ^a \pm 0,85	2,79 ^a \pm 0,61	2,71 ^a \pm 0,72

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 34. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn nell'allevamento n.º1 (Fine lattazione = circa 180 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,64 ^a \pm 0,21	1,86 ^a \pm 0,53	1,64 ^a \pm 0,27
C _{6:0}	1,29 ^a \pm 0,18	1,27 ^a \pm 0,18	1,30 ^a \pm 0,20
C _{8:0}	0,87 ^a \pm 0,13	0,86 ^a \pm 0,16	0,91 ^a \pm 0,12
C _{10:0}	2,08 ^a \pm 0,3	2,17 ^a \pm 0,68	2,27 ^a \pm 0,33
C _{12:0}	2,54 ^a \pm 0,29	2,76 ^a \pm 1,00	2,90 ^a \pm 0,39
C _{14:0}	8,51 ^a \pm 0,91	9,58 ^a \pm 2,81	9,25 ^a \pm 0,96
C _{16:0}	20,01 ^a \pm 2,22	21,39 ^a \pm 5,45	21,38 ^a \pm 2,87
C _{16:1}	1,77 ^a \pm 0,19	1,80 ^a \pm 0,38	1,83 ^a \pm 0,27
C _{18:0}	6,52 ^a \pm 0,41	6,76 ^a \pm 1,85	5,81 ^a \pm 1,35
C _{18:1}	15,74 ^a \pm 2,46	18,24 ^a \pm 4,11	15,69 ^a \pm 3,12
C _{18:2}	2,20 ^a \pm 0,39	2,62 ^a \pm 0,56	2,31 ^a \pm 0,26

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 35. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn nell'allevamento n.º1 (Intera lattazione; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	2,07 ^a \pm 0,47	2,01 ^a \pm 0,56	2,01 ^a \pm 0,54
C _{6:0}	1,36 ^a \pm 0,19	1,40 ^a \pm 0,21	1,44 ^a \pm 0,21
C _{8:0}	0,91 ^a \pm 0,18	0,97 ^{a,b} \pm 0,17	1,01 ^b \pm 0,14
C _{10:0}	2,15 ^a \pm 0,57	2,47 ^b \pm 0,72	2,49 ^b \pm 0,4
C _{12:0}	2,63 ^a \pm 0,72	3,20 ^b \pm 1,26	3,11 ^b \pm 0,53
C _{14:0}	8,90 ^a \pm 1,97	10,66 ^b \pm 2,78	10,36 ^b \pm 1,95
C _{16:0}	22,14 ^a \pm 4,25	24,99 ^a \pm 7,79	24,14 ^a \pm 5,47
C _{16:1}	1,71 ^a \pm 0,49	1,71 ^a \pm 0,47	1,57 ^a \pm 0,40
C _{18:0}	9,10 ^b \pm 2,4	7,82 ^a \pm 2,48	7,71 ^a \pm 2,41
C _{18:1}	22,14 ^b \pm 7,65	18,87 ^a \pm 4,76	18,39 ^a \pm 4,68
C _{18:2}	2,76 ^a \pm 0,74	2,80 ^a \pm 0,65	2,82 ^a \pm 0,76

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Contemporaneamente i valori medi dei dati relativi alla composizione in acidi grassi dei campioni di latte analizzati con diverso fenotipo per β -Lg sono stati suddivisi per le tre fasi principali della lattazione delle bovine (Tab. 36, 37, 38), mentre nella Tabella 39 sono stati riportati i valori medi dei dati relativi all'intera lattazione delle bovine con fenotipo per β -Lg. Dalla valutazione statistica è stata riscontrata, in particolar modo nella seconda fase della lattazione, una concentrazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) di acido caprico ($C_{10:0}$), di acido laurico ($C_{12:0}$), di acido miristico ($C_{14:0}$), di acido palmitico ($C_{16:0}$) e palmitoleico ($C_{16:1}$) e contemporaneamente una ridotta concentrazione di acido stearico ($C_{18:0}$) nel grasso del latte delle bovine con la variante B rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A. Se prendiamo in considerazione l'intera lattazione nell'allevamento n°1 emerge una concentrazione elevata ma non statisticamente significativa di acido caprico ($C_{10:0}$), di acido laurico ($C_{12:0}$) e di acido miristico ($C_{14:0}$), di acido palmitico ($C_{16:0}$) e palmitoleico ($C_{16:1}$) nel grasso del latte delle bovine con la variante B rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A.

Tabella 36. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg nell'allevamento n.º1 (Inizio lattazione = circa 60 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
$C_{4:0}$	$2,18^a \pm 0,59$	$2,13^a \pm 0,52$	$2,20^a \pm 0,56$
$C_{6:0}$	$1,47^a \pm 0,17$	$1,44^a \pm 0,16$	$1,51^a \pm 0,16$
$C_{8:0}$	$1,04^a \pm 0,16$	$0,97^a \pm 0,15$	$1,03^a \pm 0,14$
$C_{10:0}$	$2,61^a \pm 0,71$	$2,34^a \pm 0,50$	$2,37^a \pm 0,47$
$C_{12:0}$	$3,33^a \pm 1,16$	$2,88^a \pm 0,69$	$2,78^a \pm 0,56$
$C_{14:0}$	$10,28^a \pm 2,78$	$9,99^a \pm 2,27$	$8,79^a \pm 1,19$
$C_{16:0}$	$24,54^b \pm 6,88$	$23,97^b \pm 5,08$	$19,92^a \pm 2,68$
$C_{16:1}$	$1,62^a \pm 0,48$	$1,59^a \pm 0,52$	$1,39^a \pm 0,34$
$C_{18:0}$	$8,28^a \pm 2,36$	$9,22^a \pm 2,6$	$9,03^a \pm 2,71$
$C_{18:1}$	$19,09^a \pm 5,29$	$21,9^a \pm 7,29$	$19,55^a \pm 5,84$
$C_{18:2}$	$2,94^a \pm 0,72$	$3,02^a \pm 0,84$	$2,78^a \pm 0,49$

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 37. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg nell'allevamento n.º1 (Metà lattazione = circa 120 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,82 ^a \pm 0,34	2,04 ^{a,b} \pm 0,55	2,23 ^b \pm 0,61
C _{6:0}	1,35 ^a \pm 0,27	1,42 ^a \pm 0,22	1,51 ^a \pm 0,20
C _{8:0}	0,92 ^a \pm 0,19	0,99 ^{a,b} \pm 0,16	1,08 ^b \pm 0,15
C _{10:0}	2,27 ^a \pm 0,49	2,51 ^{a,b} \pm 0,53	2,96 ^b \pm 0,95
C _{12:0}	2,86 ^a \pm 0,55	3,16 ^a \pm 0,68	4,28 ^b \pm 2,00
C _{14:0}	10,08 ^a \pm 2,36	10,92 ^a \pm 1,97	13,18 ^b \pm 2,72
C _{16:0}	23,75 ^a \pm 6,27	24,98 ^a \pm 5,81	34,54 ^b \pm 8,56
C _{16:1}	1,74 ^a \pm 0,26	1,52 ^a \pm 0,32	2,07 ^b \pm 0,7
C _{18:0}	8,09 ^a \pm 1,50	8,34 ^a \pm 2,73	7,02 ^a \pm 2,32
C _{18:1}	19,49 ^a \pm 3,37	18,82 ^a \pm 5,42	19,02 ^a \pm 3,9
C _{18:2}	2,75 ^a \pm 0,45	2,75 ^a \pm 0,85	3,00 ^a \pm 0,37

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 38. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg nell'allevamento n.º1 (Fine lattazione = circa 180 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,78 ^a \pm 0,50	1,79 ^a \pm 0,49	1,74 ^a \pm 0,30
C _{6:0}	1,28 ^a \pm 0,17	1,29 ^a \pm 0,17	1,25 ^a \pm 0,22
C _{8:0}	0,90 ^a \pm 0,14	0,88 ^a \pm 0,15	0,81 ^a \pm 0,15
C _{10:0}	2,34 ^b \pm 0,61	2,24 ^{a,b} \pm 0,56	1,79 ^a \pm 0,36
C _{12:0}	3,07 ^b \pm 1,00	2,81 ^{a,b} \pm 0,70	2,19 ^a \pm 0,47
C _{14:0}	10,03 ^a \pm 3,1	9,49 ^a \pm 1,79	7,99 ^a \pm 1,44
C _{16:0}	22,27 ^a \pm 7,28	21,10 ^a \pm 2,34	19,78 ^a \pm 3,13
C _{16:1}	1,84 ^{a,b} \pm 0,37	1,69 ^a \pm 0,24	2,03 ^b \pm 0,36
C _{18:0}	5,83 ^a \pm 1,37	6,81 ^a \pm 1,56	6,76 ^a \pm 2,06
C _{18:1}	16,55 ^a \pm 4,3	16,72 ^a \pm 3,10	19,77 ^a \pm 4,19
C _{18:2}	2,58 ^a \pm 0,56	2,34 ^a \pm 0,41	2,70 ^a \pm 0,59

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 39. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg nell'allevamento n.º1 (Intera lattazione; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,96 ^a \pm 0,52	2,02 ^a \pm 0,53	2,11 ^a \pm 0,57
C _{6:0}	1,38 ^a \pm 0,22	1,40 ^a \pm 0,19	1,45 ^a \pm 0,22
C _{8:0}	0,97 ^a \pm 0,17	0,96 ^a \pm 0,16	1,00 ^a \pm 0,18
C _{10:0}	2,43 ^a \pm 0,63	2,38 ^a \pm 0,53	2,50 ^a \pm 0,84
C _{12:0}	3,11 ^a \pm 0,96	2,97 ^a \pm 0,70	3,31 ^a \pm 1,63
C _{14:0}	10,15 ^a \pm 2,69	10,23 ^a \pm 2,12	10,54 ^a \pm 3,11
C _{16:0}	23,72 ^a \pm 6,72	23,73 ^a \pm 5,11	26,31 ^a \pm 9,48
C _{16:1}	1,71 ^{a,b} \pm 0,4	1,59 ^a \pm 0,40	1,83 ^b \pm 0,61
C _{18:0}	7,62 ^a \pm 2,12	8,37 ^a \pm 2,61	7,65 ^a \pm 2,56
C _{18:1}	18,60 ^a \pm 4,57	19,64 ^a \pm 6,21	19,37 ^a \pm 4,60
C _{18:2}	2,79 ^a \pm 0,61	2,77 ^a \pm 0,81	2,86 ^a \pm 0,47

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Anche nell'allevamento n° 2 i valori medi dei dati relativi alla composizione in acidi grassi dei campioni di latte analizzati con diverso fenotipo per κ -Cn sono stati suddivisi per le tre fasi principali della lattazione delle bovine (Tab. 40, 41, 42), mentre nella Tabella 43 sono stati riportati i valori medi dei dati relativi all'intera lattazione delle bovine con fenotipo per κ -Cn.

Nello specifico, alla fine della lattazione è stata osservata un'elevata concentrazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) di acido caprico (C_{10:0}), di acido laurico (C_{12:0}) e di acido miristico (C_{14:0}) nel grasso del latte delle bovine con la variante B rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A.

Nell'intero arco della lattazione è emersa comunque una concentrazione elevata ma non statisticamente significativa di acido caprico (C_{10:0}), di acido laurico (C_{12:0}) e di acido miristico (C_{14:0}) di acido palmitico (C_{16:0}) e palmitoleico (C_{16:1}) nel grasso del latte delle bovine con la variante B rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A.

Tabella 40. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn nell'allevamento n.º2 (Inizio lattazione = circa 60 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	2,13 ^a \pm 0,18	2,33 ^a \pm 0,43	2,14 ^a \pm 0,31
C _{6:0}	1,60 ^a \pm 0,18	1,55 ^a \pm 0,27	1,46 ^a \pm 0,18
C _{8:0}	1,14 ^a \pm 0,11	1,13 ^a \pm 0,22	1,07 ^a \pm 0,18
C _{10:0}	2,66 ^a \pm 0,28	2,78 ^a \pm 0,74	2,70 ^a \pm 0,68
C _{12:0}	3,09 ^a \pm 0,31	3,25 ^a \pm 0,96	3,17 ^a \pm 0,88
C _{14:0}	9,87 ^a \pm 1,01	9,91 ^a \pm 2,50	9,60 ^a \pm 2,44
C _{16:0}	20,07 ^a \pm 2,19	20,46 ^a \pm 4,04	19,20 ^a \pm 2,27
C _{16:1}	1,57 ^a \pm 0,46	1,34 ^a \pm 0,32	1,64 ^a \pm 0,39
C _{18:0}	7,18 ^a \pm 0,56	8,13 ^a \pm 3,17	6,71 ^a \pm 1,25
C _{18:1}	15,45 ^a \pm 3,01	15,64 ^a \pm 4,39	15,58 ^a \pm 3,34
C _{18:2}	2,51 ^a \pm 0,25	2,63 ^a \pm 0,89	2,23 ^a \pm 0,32

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 41. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn nell'allevamento n.º2 (Metà lattazione = circa 120 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,95 ^a \pm 0,23	2,01 ^a \pm 0,41	1,93 ^a \pm 0,44
C _{6:0}	1,46 ^a \pm 0,23	1,37 ^a \pm 0,11	1,40 ^a \pm 0,25
C _{8:0}	1,14 ^a \pm 0,18	1,01 ^a \pm 0,12	1,04 ^a \pm 0,23
C _{10:0}	2,90 ^a \pm 0,46	2,58 ^a \pm 0,47	2,78 ^a \pm 0,73
C _{12:0}	3,50 ^a \pm 0,43	3,10 ^a \pm 0,55	3,43 ^a \pm 0,94
C _{14:0}	10,83 ^a \pm 1,11	9,67 ^a \pm 1,36	10,49 ^a \pm 2,06
C _{16:0}	19,60 ^a \pm 1,73	19,62 ^a \pm 2,01	20,54 ^a \pm 2,76
C _{16:1}	1,20 ^a \pm 0,30	1,25 ^a \pm 0,39	1,46 ^a \pm 0,46
C _{18:0}	4,84 ^a \pm 0,50	6,00 ^b \pm 1,24	5,90 ^b \pm 1,08
C _{18:1}	12,08 ^a \pm 1,98	13,19 ^a \pm 2,81	14,20 ^a \pm 3,66
C _{18:2}	1,63 ^a \pm 0,57	2,22 ^b \pm 0,62	2,13 ^b \pm 0,52

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 42. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn nell'allevamento n.º2 (Fine lattazione = circa 180 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,67 ^a \pm 0,20	1,91 ^a \pm 0,32	1,89 ^a \pm 0,37
C _{6:0}	1,22 ^a \pm 0,17	1,40 ^b \pm 0,140	1,33 ^{a,b} \pm 0,18
C _{8:0}	0,79 ^a \pm 0,14	1,01 ^b \pm 0,16	0,98 ^b \pm 0,14
C _{10:0}	1,78 ^a \pm 0,38	2,49 ^b \pm 0,50	2,53 ^b \pm 0,49
C _{12:0}	2,18 ^a \pm 0,46	3,03 ^b \pm 0,62	3,18 ^b \pm 0,70
C _{14:0}	7,92 ^a \pm 1,18	9,70 ^b \pm 1,62	10,40 ^b \pm 1,60
C _{16:0}	19,05 ^a \pm 2,47	20,14 ^a \pm 2,77	21,21 ^a \pm 2,05
C _{16:1}	1,81 ^a \pm 0,16	1,49 ^a \pm 0,38	1,76 ^a \pm 0,40
C _{18:0}	5,86 ^a \pm 0,41	5,34 ^a \pm 0,83	6,15 ^a \pm 1,25
C _{18:1}	16,85 ^b \pm 1,04	14,32 ^a \pm 2,70	16,41 ^{a,b} \pm 2,57
C _{18:2}	2,25 ^a \pm 0,60	2,26 ^a \pm 0,49	2,26 ^a \pm 0,46

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 43. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn nell'allevamento n.º2 (Intera lattazione; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo κ -Cn		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,92 ^a \pm 0,27	2,08 ^a \pm 0,42	1,98 ^a \pm 0,39
C _{6:0}	1,43 ^a \pm 0,25	1,44 ^a \pm 0,20	1,40 ^a \pm 0,21
C _{8:0}	1,04 ^a \pm 0,22	1,05 ^a \pm 0,17	1,03 ^a \pm 0,19
C _{10:0}	2,51 ^a \pm 0,61	2,61 ^a \pm 0,58	2,67 ^a \pm 0,64
C _{12:0}	3,00 ^a \pm 0,68	3,12 ^a \pm 0,72	3,27 ^a \pm 0,85
C _{14:0}	9,72 ^a \pm 1,62	9,75 ^a \pm 1,84	10,19 ^a \pm 2,06
C _{16:0}	19,58 ^a \pm 2,02	20,05 ^a \pm 2,98	20,35 ^a \pm 2,50
C _{16:1}	1,48 ^{a,b} \pm 0,41	1,36 ^a \pm 0,38	1,61 ^b \pm 0,43
C _{18:0}	5,80 ^a \pm 1,10	6,43 ^a \pm 2,26	6,23 ^a \pm 1,22
C _{18:1}	14,4 ^a \pm 2,94	14,31 ^a \pm 3,45	15,34 ^a \pm 3,33
C _{18:2}	2,06 ^a \pm 0,62	2,36 ^a \pm 0,69	2,20 ^a \pm 0,45

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

I valori medi dei dati relativi alla composizione in acidi grassi dei campioni di latte analizzati con diverso fenotipo per β -Lg sono stati suddivisi per le tre fasi principali della lattazione delle bovine (Tab. 44, 45, 46), mentre nella Tabella 47 sono stati riportati i valori medi dei dati relativi all'intera lattazione delle bovine con fenotipo per β -Lg. Dalla valutazione statistica è stata riscontrata per tutte le fasi della lattazione, una concentrazione elevata ma non statisticamente significativa di acido caprico ($C_{10:0}$), di acido laurico ($C_{12:0}$) e di acido miristico ($C_{14:0}$) e contemporaneamente una ridotta concentrazione di acido stearico ($C_{18:0}$) nel grasso del latte delle bovine con la variante B rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A.

Tabella 44. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg nell'allevamento n.º2 (Inizio lattazione = circa 60 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
$C_{4:0}$	2,13 ^a \pm 0,27	2,50 ^b \pm 0,51	2,22 ^{a,b} \pm 0,34
$C_{6:0}$	1,44 ^a \pm 0,27	1,68 ^b \pm 0,20	1,53 ^{a,b} \pm 0,11
$C_{8:0}$	1,05 ^a \pm 0,22	1,21 ^b \pm 0,12	1,14 ^{a,b} \pm 0,16
$C_{10:0}$	2,56 ^a \pm 0,71	2,97 ^a \pm 0,46	2,87 ^a \pm 0,69
$C_{12:0}$	2,98 ^a \pm 0,91	3,49 ^a \pm 0,60	3,35 ^a \pm 0,92
$C_{14:0}$	9,26 ^a \pm 2,48	11,00 ^a \pm 1,94	9,72 ^a \pm 2,12
$C_{16:0}$	19,53 ^a \pm 2,05	23,31 ^b \pm 4,55	17,95 ^a \pm 1,49
$C_{16:1}$	1,49 ^a \pm 0,39	1,42 ^a \pm 0,42	1,52 ^a \pm 0,38
$C_{18:0}$	7,02 ^a \pm 1,18	9,80 ^b \pm 4,14	6,44 ^a \pm 0,67
$C_{18:1}$	15,13 ^a \pm 3,70	17,8 ^a \pm 4,92	14,64 ^a \pm 2,29
$C_{18:2}$	2,22 ^a \pm 0,56	3,03 ^b \pm 0,87	2,44 ^a \pm 0,46

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 45. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg nell'allevamento n.º2 (Metà lattazione = circa 120 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,93 ^a \pm 0,36	2,05 ^a \pm 0,44	1,96 ^a \pm 0,40
C _{6:0}	1,42 ^a \pm 0,18	1,42 ^a \pm 0,19	1,35 ^a \pm 0,20
C _{8:0}	1,04 ^a \pm 0,17	1,08 ^a \pm 0,21	1,02 ^a \pm 0,17
C _{10:0}	2,58 ^a \pm 0,50	2,77 ^a \pm 0,73	2,78 ^a \pm 0,54
C _{12:0}	3,09 ^a \pm 0,57	3,40 ^a \pm 1,00	3,40 ^a \pm 0,60
C _{14:0}	9,76 ^a \pm 1,40	10,45 ^a \pm 2,27	10,32 ^a \pm 1,40
C _{16:0}	20,31 ^a \pm 2,52	20,53 ^a \pm 2,10	19,09 ^a \pm 1,99
C _{16:1}	1,35 ^a \pm 0,49	1,42 ^a \pm 0,19	1,20 ^a \pm 0,44
C _{18:0}	6,34 ^b \pm 1,37	5,52 ^a \pm 0,84	5,38 ^a \pm 0,85
C _{18:1}	14,55 ^b \pm 3,69	13,45 ^{a,b} \pm 1,86	12,02 ^a \pm 2,62
C _{18:2}	2,25 ^a \pm 0,76	2,09 ^a \pm 0,53	1,94 ^a \pm 0,37

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 46. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg nell'allevamento n.º2 (Fine lattazione = circa 180 giorni dopo il parto; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,85 ^a \pm 0,33	1,88 ^a \pm 0,29	1,92 ^a \pm 0,38
C _{6:0}	1,34 ^a \pm 0,12	1,39 ^a \pm 0,22	1,35 ^a \pm 0,17
C _{8:0}	0,95 ^a \pm 0,13	0,96 ^a \pm 0,21	1,00 ^a \pm 0,16
C _{10:0}	2,35 ^a \pm 0,43	2,30 ^a \pm 0,58	2,66 ^a \pm 0,56
C _{12:0}	2,95 ^{a,b} \pm 0,6	2,73 ^a \pm 0,65	3,30 ^b \pm 0,78
C _{14:0}	9,85 ^{a,b} \pm 1,61	8,85 ^a \pm 1,35	10,47 ^b \pm 1,84
C _{16:0}	20,85 ^a \pm 2,63	19,60 ^a \pm 2,59	20,53 ^a \pm 2,35
C _{16:1}	1,66 ^a \pm 0,43	1,61 ^a \pm 0,42	1,59 ^a \pm 0,32
C _{18:0}	5,84 ^a \pm 1,19	5,49 ^a \pm 0,89	5,69 ^a \pm 0,94
C _{18:1}	16,45 ^a \pm 2,65	14,48 ^a \pm 2,73	14,64 ^a \pm 2,43
C _{18:2}	2,38 ^a \pm 0,58	2,14 ^a \pm 0,49	2,20 ^a \pm 0,28

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Tabella 47. Composizione in acidi grassi del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per β -Lg nell'allevamento n.º2 (Intera lattazione; valori medi \pm D.S.).

Composizione in acidi grassi (peso % degli acidi grassi totali)	Fenotipo β -Lg		
	AA	AB	BB
C _{4:0}	1,97 ^a \pm 0,34	2,11 ^a \pm 0,48	2,02 ^a \pm 0,39
C _{6:0}	1,40 ^a \pm 0,20	1,48 ^a \pm 0,24	1,40 ^a \pm 0,19
C _{8:0}	1,01 ^a \pm 0,18	1,07 ^a \pm 0,21	1,05 ^a \pm 0,17
C _{10:0}	2,50 ^a \pm 0,57	2,66 ^a \pm 0,66	2,77 ^a \pm 0,59
C _{12:0}	3,01 ^a \pm 0,71	3,20 ^{a,b} \pm 0,85	3,35 ^b \pm 0,74
C _{14:0}	9,62 ^a \pm 1,89	10,05 ^a \pm 2,07	10,2 ^a \pm 1,76
C _{16:0}	20,22 ^{a,b} \pm 2,44	20,98 ^b \pm 3,37	19,23 ^a \pm 2,20
C _{16:1}	1,50 ^a \pm 0,45	1,49 ^a \pm 0,35	1,41 ^a \pm 0,42
C _{18:0}	6,41 ^{a,b} \pm 1,33	6,68 ^b \pm 2,94	5,77 ^a \pm 0,93
C _{18:1}	15,35 ^b \pm 3,45	14,99 ^{a,b} \pm 3,62	13,57 ^a \pm 2,75
C _{18:2}	2,28 ^a \pm 0,64	2,36 ^a \pm 0,74	2,16 ^a \pm 0,42

^{ab} Lettere differenti indicano una differenza significativa a $p < 0,05$

Concludendo, dall'osservazione dei dati relativi alla composizione in acidi grassi del latte è stato possibile notare la variazione del contenuto degli acidi grassi durante l'intero arco della lattazione in entrambi gli allevamenti, considerando soprattutto l'andamento di alcuni acidi grassi, in particolar modo quelli sintetizzati a livello della ghiandola mammaria. In generale nei due allevamenti è stata infatti osservata una elevata concentrazione di acido caprico, laurico e miristico e contemporaneamente una ridotta concentrazione di acido stearico nel grasso del latte delle bovine con la variante B rispetto al grasso del latte delle bovine con la variante omozigote per A. Nonostante ciò, degne di rilievo, appaiono le sensibili differenze all'interno dei due allevamenti, in particolar modo per quanto riguarda i valori medi dei dati relativi al contenuto degli stessi acidi grassi citati, che risultano maggiormente significativi nell'allevamento n.º1 rispetto all'allevamento n.º2.

5.4.4 Analisi della distribuzione della dimensione dei globuli di grasso nel latte di razza Frisona e Reggiana.

I dati riguardanti le osservazioni della distribuzione della dimensione dei globuli di grasso complessivamente raccolti nel corso della seconda parte di questa ricerca sono riportati nelle Figure 17 – 20 e nella Tabella 48.

Nelle Figure 17 e 19 sono stati riportati i valori medi dei dati relativi alla distribuzione della dimensione dei globuli di grasso nel latte di massa di razza Frisona e Reggiana, analizzati inizialmente nel corso di questo studio. Le Figure 18 e 20 rappresentano alcuni esempi di immagini ottenuti in microscopia in fluorescenza dei globuli di grasso rispettivamente nel latte di razza Reggiana e di razza Frisona.

Come è possibile notare nel latte di razza Reggiana la media della distribuzione della dimensione dei globuli di grasso è di $3,06\ \mu\text{m}$ (D.S. $\pm 0,89$), mentre nel latte di razza Frisona la media della distribuzione della dimensione dei globuli di grasso è di $2,98\ \mu\text{m}$ (D.S. $\pm 0,85$). Nella prima fase di questo studio, pertanto, nelle condizioni analizzate non sono state riscontrate delle differenze significative tra la distribuzione della dimensione dei globuli di grasso nel latte di massa di razza Reggiana e quella di razza Frisona. I risultati ottenuti suggeriscono infatti che, la distribuzione della dimensione dei globuli di grasso è molto simile nel latte delle due razze.

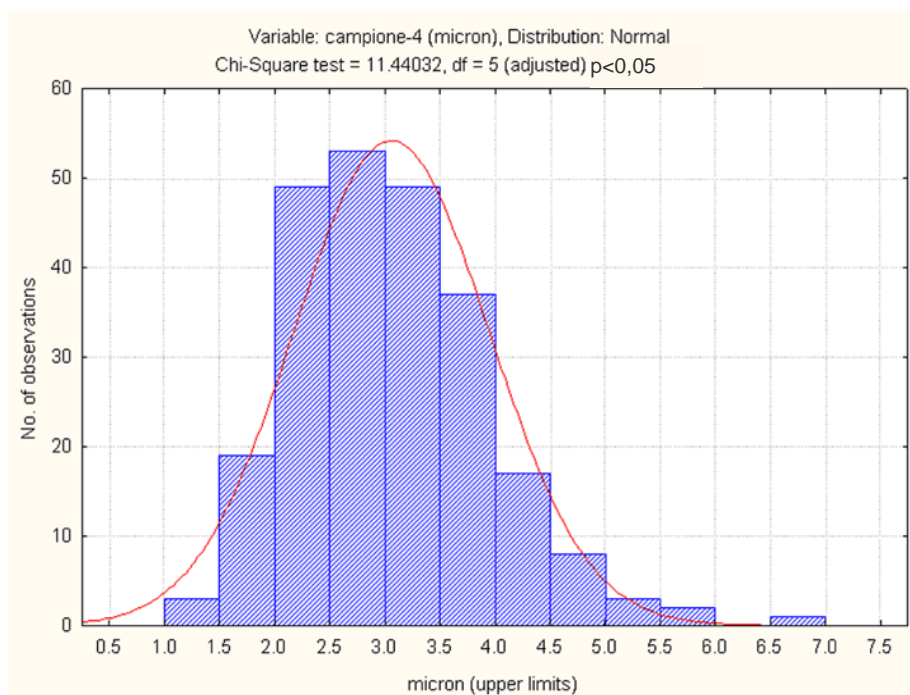


Figura 17. Distribuzione della dimensione dei globuli di grasso (μm) nel latte di massa di razza Reggiana.

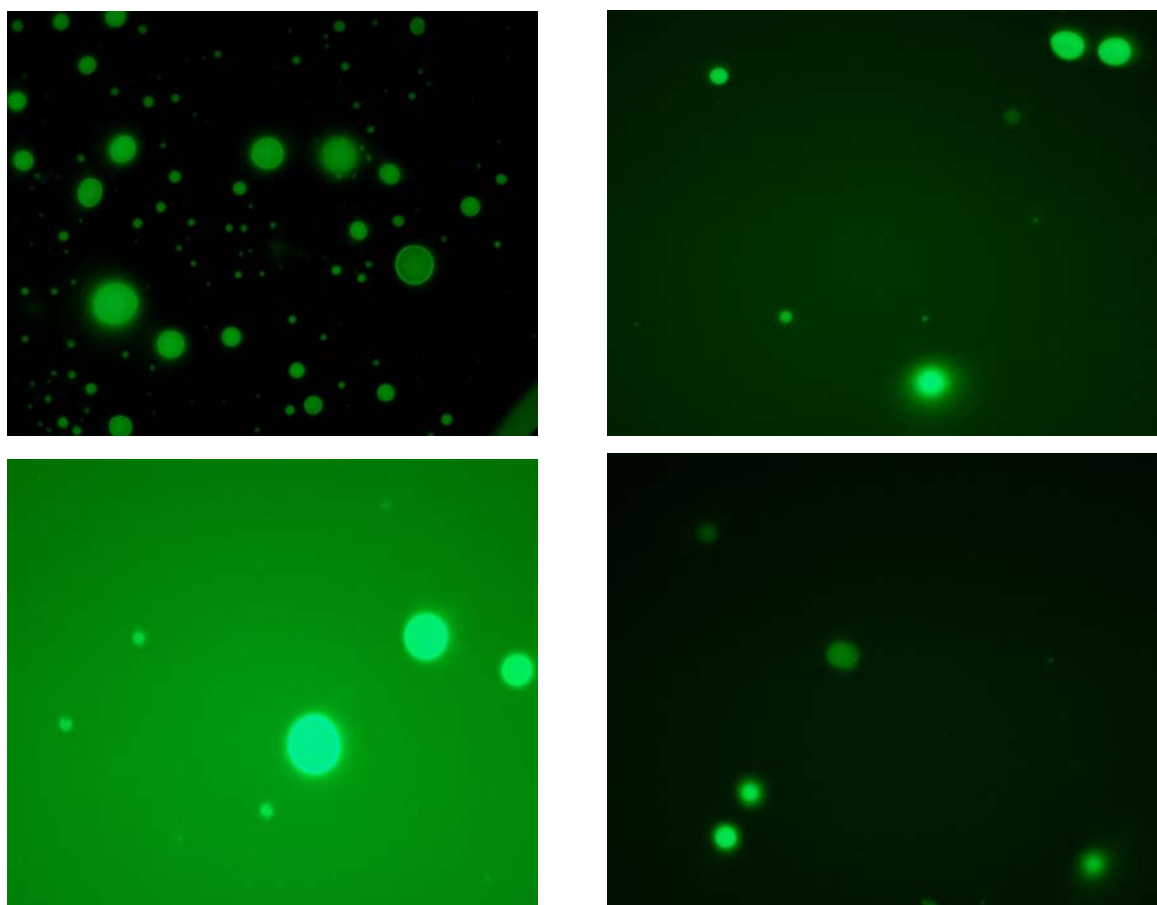


Figura 18. Esempi di immagini dei globuli di grasso nel latte di razza Reggiana.

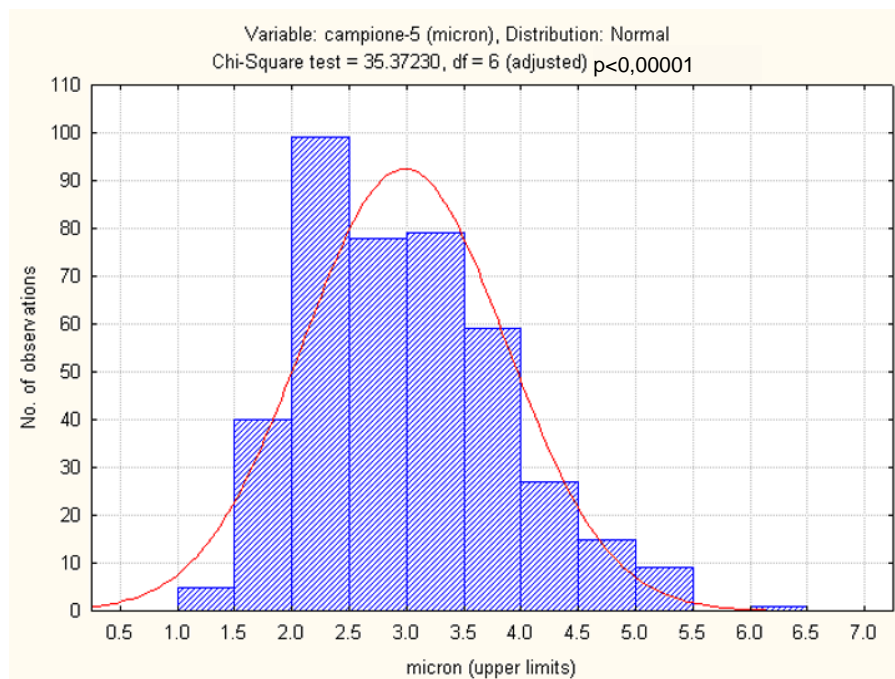


Figura 19. Distribuzione della dimensione dei globuli di grasso (μm) nel latte di massa di razza Frisona.

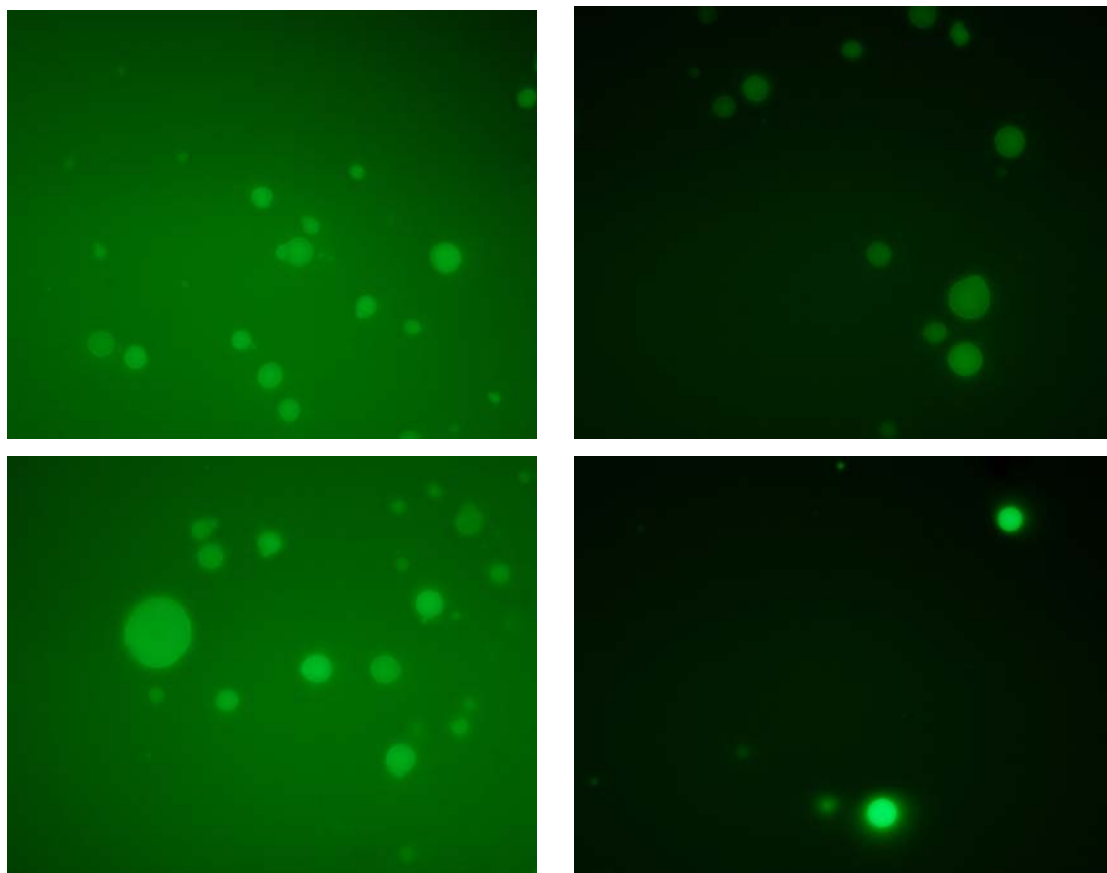


Figura 20. Esempi di immagini dei globuli di grasso nel latte di razza Frisona.

Successivamente è stato analizzato il latte individuale di 12 bovine di razza Reggiana con differente fenotipo per κ -Cn, allo scopo di valutare se il polimorfismo genetico delle proteine potesse anche influenzare la dimensione dei globuli di grasso nel latte e di conseguenza alcune caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche dei prodotti lattiero-caseari.

Nel precedente studio, infatti, è stata rilevata un'associazione tra il polimorfismo genetico e la composizione in acidi grassi nel latte di razza Reggiana, quest'ultima apparentemente influenzata dai fenotipi per κ -Cn. Pertanto in questa prova sperimentale è stata valutata la possibilità di riscontrare anche un'associazione tra il fenotipo per κ -Cn e la dimensione dei globuli di grasso nel latte di razza Reggiana.

Nella Tabella 48 ritroviamo i valori medi dei dati relativi ad alcune componenti della composizione macroscopica del latte delle bovine di razza Reggiana con differente fenotipo per κ -Cn, agli indici chimico-fisici e al contenuto in cellule somatiche registrati nell'arco di questa fase sperimentale, ma dalla valutazione dei risultati di queste analisi non sono state riscontrate delle differenze sostanziali all'interno dei diversi fenotipi per κ -Cn.

Inoltre in via preliminare, anche per quanto riguarda lo studio della distribuzione della dimensione dei globuli di grasso nel latte di razza Reggiana con fenotipo per κ -Cn, dalle prime osservazioni effettuate non sono state evidenziate delle differenze significative tra i diversi fenotipi per κ -Cn.

Una spiegazione logica potrebbe esser data dal fatto che secondo alcuni studiosi, le diverse dimensioni dei globuli di grasso sono influenzate dai fattori nutrizionali e fisiologici delle bovine, mentre i fattori genetici ed ambientali hanno un effetto limitato sulla variabilità della dimensione dei globuli di grasso [Cecchi *et al.*, 2005].

Saranno necessari, pertanto, ulteriori studi per raggiungere una definitiva conclusione e per studiare, nello specifico, l'associazione tra la distribuzione della dimensione dei globuli di grasso e i diversi fenotipi per κ -Cn nel corso di una intera lattazione per ogni singola bovina, in modo da confermare o meno l'ipotesi di una associazione tra il polimorfismo genetico delle proteine e la variabilità della dimensione dei globuli di grasso e per valutare se il fattore genetico possa influire anche sulla dimensione dei globuli di grasso.

Tabella 48. Caratteristiche chimico-fisiche e conteggio delle cellule somatiche del latte delle bovine di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn (valori medi, n = 12 campioni).

Fenotipo κ -Cn	AA	AB	BB
Latte (Kg d ⁻¹)	20,26	19,50	19,00
pH	6,75	6,71	6,64
Proteine g 100g ⁻¹	3,53	3,66	3,76
Grasso g 100g ⁻¹	3,68	3,70	3,73
Lattosio g 100g ⁻¹	4,88	4,96	4,73
Conteggio cellule somatiche 10 ³ mL ⁻¹	285	63	220

AA = 4 bovine; AB = 4 bovine; BB = 4 bovine

5.5. CONCLUSIONI

Nell'ambito di questa ricerca è stata studiata la frazione lipidica del latte, con particolare riferimento all'associazione tra il polimorfismo genetico proteico e la composizione in acidi grassi del latte bovino di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn e β -Lg. In particolare, i risultati ottenuti in questo studio potrebbero indicare profili significativi della composizione degli acidi grassi nel grasso del latte delle bovine con κ -casein BB e β -lattoglobulina BB. Infatti, dalle prime osservazioni ottenute, è stato possibile riscontrare delle differenze statisticamente significative per quanto riguarda la concentrazione di alcuni acidi grassi sintetizzati *de novo* nel grasso del latte delle bovine con differenti fenotipi per κ -Cn e per β -Lg. Tali differenze possono pertanto suggerire ai ricercatori impegnati nel campo della selezione genetica, di poter migliorare la struttura e le proprietà sensoriali e fisico-chimiche di molti prodotti lattiero-caseari, attraverso la selezione della variante B, in particolar modo della κ -Cn, già considerata di rilevante importanza nel settore delle produzioni e delle trasformazioni casearie, in quanto le maggiori concentrazioni dall'acido laurico all'acido palmitico nel grasso del latte sono associate con una maggiore struttura e un miglior gusto rispettivamente del burro e del formaggio. Nel corso di questo studio, inoltre, è stata osservata la distribuzione della dimensione dei globuli di grasso nel latte bovino di razza Reggiana e Frisona e nel latte individuale di sola razza Reggiana con differente fenotipo per κ -Cn. Tuttavia dalle prime osservazioni effettuate non sono state riscontrate delle differenze significative tra il latte di massa di razza Reggiana e quello di razza Frisona e nel latte di razza Reggiana con differenti fenotipi per κ -Cn. Infatti secondo alcuni studiosi, la variabilità delle dimensioni dei globuli di grasso nel latte è influenzata dai fattori nutrizionali e fisiologici delle bovine piuttosto che dai fattori genetici e ambientali. Pertanto ulteriori studi saranno necessari per stabilire se è possibile considerare una associazione tra il polimorfismo genetico delle proteine e la variabilità della dimensione dei globuli di grasso, soprattutto in quanto quest'ultima ha assunto negli ultimi anni una notevole importanza determinata dall'associazione tra la dimensione dei globuli di grasso e la composizione in acidi grassi del latte, che di conseguenza è associata alle caratteristiche tecnologiche e sensoriali dei prodotti lattiero-caseari.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'APA (Associazione Provinciale Allevatori), in particolare il dott. Clinio Villa per la sua disponibilità, l'Università degli Studi di Bologna (sede di Cesena) per la collaborazione nel corso di questo studio e il Dott. Gianotti A. (Università degli Studi di Bologna) per il suo contributo nella seconda parte di questa ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AbuGhazaleh A.A., Schingoethe D.J., Hippen A.R., Kalscheur K.F., Conjugated linoleic acid increases in milk when cows fed fish meal and extruded soybeans for an extended period of time, *J. Dairy Sci.* **87** (2004) 1758-1766.
- 2) Alais C., Scienza del latte, *Tecniche Nuove (Ed.)*, Milano, 2000.
- 3) Aleandri R., Buttazzoni L.G., Schneider J.C., Caroli A., Davoli R., The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability, *J. Dairy Sci.* **73** (1990) 241-255.
- 4) Amigo L., Recio I., Ramos M., Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – a review, *Int. Dairy J.* **10** (2000) 135-149.
- 5) Antongiovanni M., Buccioni A., Mele M., Strategie nutrizionali per il miglioramento della frazione lipidica degli alimenti di origine animale, *Atti Conv. "Giornata di studio su: latte e carne dei ruminanti componente lipidica e salute umana"*, Firenze, 6 marzo 2002.
- 6) Argov N., Lemay D.G., German J.B., Milk fat globule structure and function: nanoscience comes to milk production, *Trends in Food Science & Technology* (2008) DOI: 10.1016/j.tifs.2008.07.006.
- 7) Aschaffenburg R., Drewry J., Occurrence of different β -Lg in cow's milk, *Nature* **176** (1955) 218-219.
- 8) Ashes J.R., Gulati S.K., Cook L.J., Scott T.W., Donnelly J.B., Assessing the biological effectiveness of protected lipid supplements for ruminants, *JAOCs* **56** (1979) 522-527.

- 9) Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th Ed. AOAC, Washington, USA, 1990, pp. 811.
- 10) Ballarini G., Elogio del burro, *Latte* **23** (1998) 103-106.
- 11) Ballarini G., Latte ed alimentazione evoluzionistica, *La Selezione Vet.* **4** (2000), 231-257.
- 12) Ballester M., Sánchez A., Folch J.M., Polymorphisms in the goat β -lactoglobulin gene, *J. Dairy Res.* **72** (2005) 379–384.
- 13) Banni S., Angioni E., Carta G., Casu V., Deiana M., Dessì M.A., Influence of dietary conjugated linoleic acid on lipid metabolism in relation of its anticarcinogenic activity, in: Advances in conjugated linoleic acid research, vol.1, *AOCS Press (Ed.)*, Champaign IL, 1999, pp. 307-18.
- 14) Bastian E.D., Brown R.J., Plasmin in milk and dairy products: an update, *Int. Dairy J.* **6** (1996) 435-457.
- 15) Bell K., Hopper K.E., McKenzie H.A., Bovine α -lactalbumin C and α_{s1} -, β -, κ -caseins of Bali (Banteng) cattle, *Bos (Bibos) javanicus*, *Aust. J. Biol. Sci.* **34** (1981) 149-159.
- 16) Bell S.J., Jaglowski R., Grochoski G., Science behind milk with different genetic variants, *J. Am. Diet. Assoc.*, **108** (2008) A78.
- 17) Bernal-Santos G., Perfield J.W., Barbano D.M., Bauman D.E., Overton T.R., Production responses of dairy cows to dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) during the transition period and early lactation, *J. Dairy Sci.* **86** (2003) 3218-3228.

- 18) Berra B., Bellia G., Montorfano G., Acidi grassi ω -3: nutrienti, alimenti funzionali, farmaci?, *Progr. Nutr.* **5** (2003) 149-159.
- 19) Bleck G.T., Bremel R.D., Correlation of the α -lactalbumin (+15) polymorphism to milk production and milk composition of Holsteins, *J. Dairy Sci.* **76** (1993) 2292-2298.
- 20) Bobe G., Beitz D.C., Freeman A.E., Lindberg G.L., Associations among individual proteins and fatty acids in bovine milk as determined by correlations and factor analyses, *J. Dairy Res.* **66** (1999) 523-536.
- 21) Bobe G., Hammond E.G., Freeman A.E., Lindberg G.L., Beitz D.C., Texture of butter from cows with different milk fatty acid compositions, *J. Dairy Sci.* **86** (2003) 3122-3127.
- 22) Bobe G., Freeman A.E., Lindberg G.L., Beitz D.C., The influence of milk protein phenotypes on fatty acid composition of milk from Holstein cows, *Milchwissenschaft* **59** (2004) 3-6.
- 23) Bonfatti V., Grigoletto L., Cecchinato A., Gallo L., Carnier P., Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants, *J. Chromatogr. A* **1195** (2008) 101-106.
- 24) Boutonnier J.L., Aliments, a votre bonne sante, *Revue des ENIL* **231** (2000) 7-13.
- 25) Bovenhuis H., Van Arendonk J.A.M., Korver S., Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits, *J. Dairy Sci.* **75** (1992) 2549-2559.
- 26) Briard V., Leconte N., Michel F., Michalski M.C., The fatty acid compotion of small and large naturally occuring milk fat globules, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105** (2003) 677-682.

- 27) Brownlow S., Morais Cabral J.H., Cooper R., Folwer D.R., Yewdall S.J., Polikarpov I., North A.C.T., Sawyer L., Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution still an enigmatic lipocalin, *Structure* **5** (1997) 481-495.
- 28) Brunelli E., Le proteine del latte, *Il Latte*, 10 (2008) 78-80.
- 29) Buccioni A. Petacchi F., Antongiovanni M., Attività ruminali e presenza di acidi grassi *trans* e di CLA nei lipidi del latte e della carne, *Atti Conv. "Giornata di studio su: latte e carne dei ruminanti componente lipidica e salute umana"*, Firenze, 6 marzo 2002.
- 30) Burr R.G., Moore C.H., Hill J.P., ESI-MS Phenotyping of bovine β -lactoglobulin genetic variants in a New Zealand dairy cattle population, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 340-344.
- 31) Caboni M.F., Lercker G., Losi G., Composizione del grasso del latte: nota II determinazione dei fosfolipidi, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **34** (1983) 7-19.
- 32) Caponio F., Clodoveo M.L., Pasqualone A., Confronto degli effetti della cottura a microonde e di quella tradizionale sugli acidi grassi polinsaturi ω 3 dell'olio di soia, *Progr. Nutr.* **5** (2003) 176.
- 33) Carroll S.M., DePeters E.J., Taylor S.J., Rosenberg M., Perez-Monti H., capps V.A., Milk composition of Holstein, Jersey and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat *Anim. Feed Sci. Technol.* **131** (2006) 451-473.
- 34) Castagnetti G.B., Grazia L., Losi G., Mariani P., Il latte della Reggiana nella produzione del Parmigiano-Reggiano. II Prove di caseificazione (1), *L'industria del latte* **2** (1986) 3-21.

- 35) Cecchi F., Martini M., Salari F., The repeatability of morphometric characteristics of milk fat globules from Massese ewes during lactation, *Milchwissenschaft* **60** (2005) 386-388.
- 36) Chamba J.F., Chardigny J.M., Gnadig S., Perreard E., Chappaz S., Rickert R., Conjugated linoleic acid (CLA) content of French Emmental cheese: effect of the season region of production, processing and culinary preparation, *Lait* **86** (2006) 461-467.
- 37) Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M., Doreau M., Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids, *Ann. Zootech.* **49** (2000) 181-205.
- 38) Chilliard Y., Rouel J., Leroux C., Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios, *Anim. Feed Sci. Technol.* **131** (2006) 474-487.
- 39) Chin D., Ng-Kwai-Hang K.F., Application of Mass Spectrometry for the identification of genetic variants of milk proteins, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 334-339.
- 40) Christie W.W. The preparation of derivatives of fatty acids, in: Gas Chromatography and Lipids, *The Oily Press (Ed.)*, Ayr, Scotland, 1998, pp. 64-84.
- 41) Collomb M., Bütikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J.O., Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography, *Int. Dairy J.* **12** (2002) 649-659.
- 42) Conti A., Napolitano L., Cantisani A.M., Davoli R., Dall'Olio S., Bovine β -lactoglobulin H: Isolation by preparative isoelectric focusing immobilizer pH

- gradients and preliminary characterization, *J. Biochem. Biophys. Methods* **16** (1988) 205-214.
- 43) Corl B.A., Butler S.T., Butler W.R., Bauman D.E., Short communication: Regulation of milk fat yield and fatty acid composition by insulin, *J. Dairy Sci.* **89** (2006) 4172-4175.
- 44) Corradini C., Chimica e tecnologia del latte, *Tecniche Nuove (Ed.)*, Milano, 1995.
- 45) Corradini C., Proprietà funzionali delle sieroproteine in preparazioni alimentari, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **49** (1998) 204-213.
- 46) Couvreur S., Hurtaud C., Lpopez C., Delaby L., Peyraud J.L., The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition and butter properties, *J. Dairy Sci.* **89** (2006) 1956-1969.
- 47) Creamer L.K., Harris D.P., Relationship between milk protein polymorphism and physico-chemical properties, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 110-123.
- 48) Creamer L.K., Plowman J.E., Liddell M.J., Smith M.H., Hill J.P., Micelle stability κ -casein structure and function, *J. Dairy Sci.* **81** (1998) 3004-3012.
- 49) Creamer L.K., Nilsson H.C., Paulsson M.A., Coker C.J., Hill J.P., Jiménez-Flores R., Effect of genetic variation on the tryptic hidrolisis of bovine β -lactoglobulin A, B and C, *J. Dairy Sci.* **87** (2004) 4023-4032.
- 50) Crudden A., Kelly A.L., Studies of plasmin activity in whey, *Int. Dairy J.* **13** (2003) 987-993.
- 51) Crudden A., Fox P.F., Kelly A.L., Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk, *Int. Dairy J.* **15** (2005) 305-313.

- 52) Danthine S., Blecker B., Paquot M., Innocente N., Deroanne C., Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait: synthèse bibliographique, *Lait* **80** (2000) 209-222.
- 53) Davis J.P., Foegeding E.A., Foaming and interfacial properties of polymerized whey protein isolat, *Food Chem. Toxicol.* **69** (2004) 404-410.
- 54) Davoli R., Determinazione delle varianti genetiche delle proteine del latte mediante elettroforesi su acetato di cellulosa, *Riv. Zoot. Vet.* **9** (2) (1981) 96-100.
- 55) Davoli R., Dall'Olio S., Bigi D., A new β -lactoglobulin variant in bovine milk, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **39** (1988) 439-443.
- 56) Delmonte P.L., Bertolini L., Losi G., Castagnetti G.B., Valorizzazione dei CLA (Conjugated Linoleic Acids) nel latte: significato biologico, prospettive analitiche ed applicative, *Atti Conv. "Metodologie avanzate di ricerca e tematiche strategiche per lo sviluppo del settore agro-alimentare"*, Mosciano Stazione (TE), 6-7 Dicembre 2000.
- 57) Destailats F., Japiot C., Chouinard P.Y., Arul J., Angers P., Short communication: rearrangement of rumenic acid in ruminant fats: a marker of thermal treatment, *J. Dairy Sci.* **88** (2005) 1631-35.
- 58) De Veth M.J., Gulati S.K., Luchini N.D., Bauman D.E., Comparison of calcium salts and formaldehyde-protected conjugated linoleic acid in inducing milk fat depression, *J. Dairy Sci.* **88** (2005) 1685-1693.
- 59) Dewettinck K., Rombaut R., Thienpont N., Trung Le T., Messens K., Van Camp J., Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material, *Int. Dairy J.* **18** (2008) 436-457.

- 60) Dhiman T.R., Helmink E.D., McMahon D.J., Fife R.L., Pariza M.W., Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds, *J. Dairy Sci.* **82** (1999) 412-419.
- 61) Diolaiti F., Manto rosso e latte super per la vacca Reggiana, *Agricoltura*, aprile, (2008) 122-123.
- 62) Dong C., Ng-Kwai-Hang K.F., Characterization of a non-electrophoretic genetic variant of β -casein by peptide mapping and mass spectroscopic analysis, *Int. Dairy J.* **8** (1998) 967-972.
- 63) Doreau M., Ferlay A., Digestion and utilization of fatty acids by ruminant, *Anim. Feed Sci. Technol.* **45** (1994) 379-396.
- 64) Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell H.M., Harwalkar V.R., Jenness R., Whitney R. McL., Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision, *J. Dairy Sci.* **67** (1984) 1599-1631.
- 65) Erhardt G., A new α_{s1} -casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds., *Anim. Genet.* **24** (1993) 65-66.
- 66) Euston S.R., Hirst R.L., Hill J.P., Emulsifying properties of milk protein genetic variants, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 395-410.
- 67) Evers J.M., The milkfat globule membrane – compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell, *Int. Dairy J.* **14** (2004) 661-674.
- 68) Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Swaisgood H.E., Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision, *J. Dairy Sci.* **87** (2004) 1641-1674.

- 69) Fauquant C., Briad V., Leconte N., Michalski M.C., Differently sized native milk fat globules separated by microfiltration: fatty acid composition of the milk fat globule membrane and triglyceride core, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **107** (2005) 80-86.
- 70) Ferlay A., Chabrot J., Elmeddah Y., Doreau M., Ruminant lipid balance and intestinal digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil, *J. Anim. Sci.* **71** (1993) 2237-2245.
- 71) Ferlay A., Martin B., Pradel P., Coulon J.B., Chilliard Y., Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbéliarde cow breeds, *J. Dairy Sci.* **89** (2006) 4026-4041.
- 72) Ferlay A., Agabriel C., Sibra C., Journal C., Martin B., Chilliard Y., Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi-mountain area, *Lait* **88** (2008) 193-215.
- 73) FitzGerald R.J., Hill J.P., The relationship between milk protein polymorphism and the manufacture and functionality of dairy products, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 355-371.
- 74) Fong B.Y., Norris C.S., MacGibbon A.H.M., Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane, *Int. Dairy J.* **17** (2007) 275-288.
- 75) Fredeen A.H., Considerations in the nutritional modification of milk composition, *Anim. Feed Sci. Technol.* **59** (1996) 185-197.
- 76) Gabaldo G., De Palma A., Fusari A., Gaino S., Mastrangelo D., Pizzicara M., Tinelli S., Ubaldi A., L'uso degli acidi grassi polinsaturi (FOG3) nel periodo di transizione della bovina da latte, *Journal of the Italian Association for Buiatrics* **2** (2007) 1-21.

- 77) García S.C., Holmes C.W., Lactation curves of autumn- and spring-calved cows in pasture-based dairy systems, *Liv. Prod. Sci.* **68** (2001) 189-203.
- 78) Gastaldi E., Trial N., Guillaume C., Bourret E., Gontard N., Cuq J.L., Effect of controlled κ -casein hydrolysis on rheological properties of acid milk gels, *J. Dairy Sci.* **86** (2003) 704-711.
- 79) Griinari J.M., Corl B.A., Lacy S.H., Chouinard P.Y., Nurmela K.V.V., Bauman D.E., Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 desaturase, *J. Nutr.* **130** (2000) 2285-2291.
- 80) Godovac-Zimmermann J., Krause I., Buchberger J., Weiss G., Klostermeyer H., Genetic variants of bovine β -lactoglobulin. A novel wild-type β -lactoglobulin W and its primary sequence, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **371** (1990) 255-260.
- 81) Godovac-Zimmermann J., Krause I., Baranyi M., Fischer-Frühholz S., Juszczak J., Erhardt G., Buchberger J., Klostermeyer H., Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine β -lactoglobulins I and J, *J. Protein Chem.* **15** (1996) 743-750.
- 82) Han S.K., Shin Y.C., Byun H.D., Biochemical, molecular and physiological characterization of a new β -casein variant detected in Korean cattle, *Anim. Gent.* **31** (2000) 49-51.
- 83) Harrison R., Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles, *Int. Dairy J.* **16** (2006) 546-554.
- 84) Heid H.W., Keenan T.W., Intracellular origin and secretion of milk fat globules, *Eur. J. Cell Biol.* **84** (2005) 245-258.
- 85) Hill J.P., The relationship between β -Lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle, *J. Dairy Sci.* **76** (1993) 281-286.

- 86) Hill J.P., Paterson G.R., MacGibbon A.K.H., Joint effect of β -lactoglobulin and κ -casein variants on the heat stability of milk, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 231-236.
- 87) Iametti S., Versuraro L., Tragna S., Giangiacomo R., Bonomi F., Surface properties of the fat globule in treated creams, *Int. Dairy J.* **7** (1997) 375-380.
- 88) Jacob E., Puhan Z., Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins – A review, *Int. Dairy J.* **2** (1992) 157-178.
- 89) Jameson G.B., Adamsa J.J., Creamer L.K., Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin, *Int. Dairy J.* **12** (2002) 319-329.
- 90) Jann O., Ceriotti G., Caroli A., Erhardt G., A new variant in exon VII of the bovine β -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds, *J. Anim. Breed. Genet.* **119** (2002) 65-68.
- 91) Jenkins T.C., Lipid metabolism in the rumen, *J. Dairy Sci.* **76** (1993) 3851-3859.
- 92) Jenkins TC., McGuire M.A., Major advances in nutrition: impact on milk composition, *J. Dairy Sci.* **89** (2006) 1302-10.
- 93) Jiang J., Bjoerck L., Fonden R., Emanuelson M., Occurrence of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen, *J. Dairy Sci.* **79** (1996) 438-445.
- 94) Jiang J., Bjoerck L., Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures, *J. Appl. Microbiol.* **85** (1998) 95-102.

- 95) Kay J.K., Mackle T.R., Auldist M.J., Thomson N.A., Bauman D.E., Endogenous synthesis of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture, *J. Dairy Sci.* **87** (2004) 369-378.
- 96) Keenan T.W., Patton S., The structure of milk: implications for sampling and storage. A. The milk lipid globule membrane, in: Handbook of milk composition, *Jensen R.G., (Ed.)*, San Diego, 1995, pp. 5-50.
- 97) Kelsey J.A., Cori B.A., Collier R.J., Bauman D.E., The effect of breed, parity and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows, *J. Dairy Sci.* **86** (2003) 2588-97.
- 98) Khanal R.C., Dhiman T.R., Ure A.L., Brennand C.P., Boman R.L., McMahon D.J., Consumer acceptability of conjugated linoleic acid-enriched milk and Cheddar cheese from cows grazing on pasture, *J. Dairy Sci.* **88** (2005) 1837-1847.
- 99) Khanal R.C., Dhiman T.R., Boman R.L., Changes in fatty acid composition of milk from lactating dairy cows during transition to and from pasture, *Liv. Sci.* **114** (2008) 164-175.
- 100) Kontopidis G., Holt C., Sawyer L., Invited Review: β -lactoglobulin: binding properties, structure and function, *J. Dairy Sci.* **87** (2004) 785-796.
- 101) Kraggerud H., Skeie S., Hoy M., Rokke L., Abrahamsen R.K., Season and ripening temperature influence fatty acid composition and sensory properties of semi-hard cheese during maturation, *Int. Dairy J.* **18** (2008) 801-810.
- 102) Kumosinski T.F., Brown E.M., Farrell H.M., Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: κ -Casein, *J. Dairy Sci.* **74** (1991) 2879-2887.
- 103) Kuzdzal-Savoie S., La matiere grasse, in: Le lait matière première de l'industrie laitière, *INRA-CEPIL (Ed.)*, Paris, 1987, pp. 41-62.

- 104) Lanni C., Microscopia ottica: evoluzione dalla fluorescenza tradizionale a quella confocale, *Laboratorio 2000* **6** (2008) 50-56.
- 105) Lawless F., Murphy J.J., Harrington D., Devery R., Stanton C., Elevation of conjugated *cis*-9,*trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation, *J. Dairy Sci.* **81** (1998) 3259-3267.
- 106) Lee S.J., Sherbon J.W., Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by treatment and homogenization of whole milk, *J. Dairy Res.* **69** (2002) 555-567.
- 107) Lefèvre T., Subirade M., Interaction of β -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy, *Int. J. Biol. Macromol.* **28** (2000) 59-67.
- 108) Looor J.J., Ferlay A., Ollier A., Doreau M., Chillard Y., Relation among *trans* and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil, *J. Dairy Sci.* **88** (2005) 726-740.
- 109) Lopez C., Briad-Bion V., The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products, *Lait* **87** (2007a) 317-336.
- 110) Lopez C., Camier B., Gassi J.Y., Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy, *Int. Dairy J.* **17** (2007) 235-247.
- 111) Lòpez Huertas E., Bairò L., Carrero J.J., Fonollà J., Jimènez J., Boza J.J., n-3-fatty acids: health effects and opportunities to increase intake, *Agro Food. Ind. Hi-Tech* **3** (2003) 18-21.

- 112) Losi G., Capella P., Castagnetti G.B., Grazia L., Zambonelli C., Mariani P., Russo V., Influenza delle varianti genetiche della caseina κ sulla formazione e sulle caratteristiche della cagliata, *Scienza e Tecnologia degli Alimenti* **3** (1973) 373-374.
- 113) Lourenco M., Van Ranst G., Vlaeminck B., De Smet S., Fievez V., Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk, *Anim. Feed Sci. Technol.* **145** (2008) 418-437.
- 114) Lucas A., Rock E., Chamba J.F., Verdier-Metz I., Brachet P., Coulon J.B., Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest, *Lait* **86** (2006) 21-41.
- 115) Lundén A., Nilsson M., Janson L., Marked Effect of β -Lactoglobulin Polymorphism on the Ratio of Casein to Total Protein in Milk, *J. Dairy Sci.* **80** (1997) 2996-300.
- 116) MacGibbon A.K.H., van der Does Y.E.H., Hill J.P., The effect of beta-lactoglobulin phenotype on the content, composition and properties of fat in milk, and on the manufacture and properties of butter, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 434-439.
- 117) Macheboeuf D., Coulon J.B., D'Hour P., Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows' milk coagulation properties, *J. Dairy Res.* **60** (1993) 43-54.
- 118) Mackle T.R., Bryant A.M., Petch S.F., Hill J.P., Auldist M.J., Nutritional influences on the composition of milk from cows of different protein phenotypes in New Zealand, *J. Dairy Sci.* **82** (1999) 172-180.

- 119) Mahé M.F., Miranda G., Queral R., Bado A., Souvenir-Zafidrajaona P., Grosclaude F., Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations characterization of variants α_{s1} -Cn H and κ -Cn J, *Génét. Sél. Evol.* **31** (1999) 239-253.
- 120) Malacarne M., Summer A., Formaggioni P., Franceschi P., Mariani P., Composizione in acidi grassi del grasso del latte di quattro razze bovine allevate nella zona di produzione del Parmigiano Reggiano, *Annali Fac. Med. Veterinaria dell'Università di Parma* **21** (2001) 249-259.
- 121) Manderson G.A., Hardman M.J., Creamer L.K., Spectroscopic examination of the heat-induced changes in β -lactoglobulin A, B and C, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 204-211.
- 122) Mariani P., Russo V., Distribuzione delle varianti genetiche delle caseine e della β -lattoglobulina nelle vacche di razza Reggiana, *Riv. Zoot.* **44** (1971) 310-323.
- 123) Mariani P., Ripartizione delle proteine del latte nelle razze Frisona, Bruna Alpina, Reggiana e Modenese, *Riv. Zoot. Vet.* **3** (1975) 13-35.
- 124) Mariani P., Losi G., Russo V., Castagnetti G.B., Grazia L., Morini D., Fossa E., Prove di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B della κ -caseina nella produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **27** (1976) 208-227.
- 125) Mariani P., Morini D., Losi G., Castagnetti G.B., Fossa E., Russo V., Ripartizione delle frazioni azotate del latte in vacche caratterizzate da genotipo diverso nel locus β -lattoglobulina, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **30** (1979b) 153-176.

- 126) Mariani P., Losi G., Morini D., Castagnetti G.B., Citric acid content in the milk of cows with different genotypes in the κ -casein locus, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **30** (1979a) 375-384.
- 127) Mariani P., Pecorari M., Fattori genetici, attitudine alla caseificazione e resa del latte in formaggio, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **38** (1987) 286-326.
- 128) Mariani P., Pecorari M., Il ruolo delle varianti genetiche della κ -caseina nella produzione del formaggio, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **42** (1991) 255-285.
- 129) Mariani P., Summer A., Anghinetti A., Senese C., Di Gregorio P., Rando P., Serventi P., Effects of the α_{s1} -CN G allele on the percentage distribution of caseins α_{s1} -, α_{s2} -, β -, and κ - in Italian Brown cows, *Ind. Latte* **31** (1995) 3-13.
- 130) Mariani P., Summer A., Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **50** (1999) 197-230.
- 131) Martin P., Ollivier-Bousquet M., Grosclaude F., Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization, *Int. Dairy J.* **9** (1999) 163-171.
- 132) Martini M., Scolozzi C., Cecchi F., Studio delle correlazioni tra caratteristiche morfometriche del globulo di grasso e qualità del latte di bufala, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **56** (2005) 197-204.
- 133) Martini M., Scolozzi C., Cecchi F., Mele M., Salari F., Relationship between morphometric characteristics of milk fat globules and the cheese making aptitude of sheep's milk, *Small Ruminant Res.* **74** (2008) 194-201.
- 134) Mayer H.K., Ortner M., Tschager E., Ginzinger W., Composite milk protein phenotypes in relation to composition and cheesemaking properties of milk, *Int. Dairy J.* **7** (1997) 305-310.

- 135) McLean D.M., Graham E.R., Ponzoni R.W., McKenzie H.A., Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition, *J. Dairy Res.* **51** (1984) 531-546.
- 136) McPherson A., Kitchen B.J., Review of the progress of Dairy Science: The bovine milk fat globule membrane - its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products, *J. Dairy Res.* **50** (1983) 107-133.
- 137) Mele M., Serra A., Manzo M., Paoletti F., Secchiari P., La sintesi endomammaria di CLA nei ruminanti, *Atti Conv. "Giornata di studio su: latte e carne dei ruminanti componente lipidica e salute umana"*, Firenze, 6 marzo 2002, pp. 129-157.
- 138) Melis M.P., Murru E., Lucchi L., Batetta B., Cordeddu L., Petroni A., Metabolismo del CLA nell'uomo in relazione a diversi stati patologici, *Prog. Nutr.* **5** (2003) 199-200.
- 139) Mensink R.P., Temme E., H.M., Plat J., Dietary fats and coronary heart disease, in: *Food Lipids, Akoh C. C., C. Min D.B. (Ed.)*, New York, USA, 1998, pp. 507-535.
- 140) Mercier J.C., Brignon G., Ribadeau-Dumas B., Structure primaire de la caseine κ -bovine B. Sequence complete, *Eur. J. Biochem.* **35** (1973) 222-235.
- 141) Michalski M.C., Michel F., Sainmont D., Briard V., Apparent ζ -potential as tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **23** (2001) 23-30.
- 142) Michalski M.C., Cariou R., Michel F., Garnier C., Native vs damaged milk fat globules: membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels, *J. Dairy Sci.* **85** (2002) 2451-2461.

- 143) Michalski M.C., Gassi J.Y., Famelart M.H., Leconte N., Camier B., Michel F., Briard V., The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese, *Lait* **83** (2003) 131-143.
- 144) Michalski M.C., Ollivon M., Briard V., Leconte N., Lopez C., Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior, *Chem. Phys. Lipids* **132** (2004) 247-261.
- 145) Michalski M.C., Briard V., Juaneda P., CLA profile in native fat globules of different sizes selected from raw milk, *Int. Dairy J.* **15** (2005a) 1089-1094.
- 146) Michalski M.C., Briard V., Michel F., Tasson F., Poulain P., size distribution of fat globules in human colostrums, breast milk and infant formula, *J. Dairy Sci.* **88** (2005b) 1927-1940.
- 147) Michalski M.C., Metabolic importance of milk fat globule structure. *INFORM* **18**, 2, (2007a) 86-88.
- 148) Michalski M.C., Camier B., Gassi J.Y., Briard-Bion V., Leconte N., Famelart M.H., Lopez C., Functionality of smaller vs control native milk fat globule in Emmental cheeses manufactured with adapted technologies, *Food Res. Int.* **40** (2007b) 191-202.
- 149) Miranda G., Anglade P., Mahé M.F., Erhardt G., Biochemical characterization of the bovine genetic kappa-casein C and E variants, *Anim. Genet.* **4** (1993) 27-31.
- 150) Morin P., Jiménez-Flores R., Pouliot Y., Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes, *Int. Dairy J.* **17** (2007) 1179-1187.

- 151) Morini D., Losi G., Castagnetti G.B., Benevelli M., Resmini P., Volontario G., L'influenza delle varianti genetiche della κ -Caseina sulla dimensione delle micelle caseiniche, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **26** (1975) 437-444.
- 152) Morini D., Castagnetti G.B., Grazia L., Losi G., Mariani P., Il latte della Reggiana nella produzione del Parmigiano-Reggiano, *L'industria del latte* **4** (1983) 19-40.
- 153) Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes J.F., Moxley J.E., Monardes H.G., Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows, *J. Dairy Sci.* **69** (1986) 22-26.
- 154) Ng-Kwai-Hang K.F., Grosclaude F., Genetic polymorphism of milk proteins, in: Advanced Dairy Chemistry 1, Proteins, Elsevier Applied Science, Fox P.F. (Ed.), London, 1992, pp. 405-455.
- 155) Ng-Kwai-Hang K.F., A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production, in: Milk Protein Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed.* (Ed.), Brussels, Belgium, 1997, pp. 22-37.
- 156) Nielson B.T., Singh H. Latham J., Aggregation of bovine β -lactoglobulins A and B on heating at 75 C°, *Int. Dairy J.* **6** (1996) 519-527.
- 157) Nuyts-Petit V., Delacroix-Buchet A., Vassal L., influence de trios haplotypes des caséines α_{s1} , β et κ fréquents en race bovine Normande sur la composition du lait et l'aptitude à la fabrication fromagère, *Lait* **77** (1997) 625-639.
- 158) Ojala M., Famula T.R., Medrano J.F., Effect of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California, *J. Dairy Sci.* **80** (1997) 1776-1785.

- 159) O'Keefe S.F., Nomenclature and classification of lipids, in: Food Lipids, Akoh C. C., C. Min D.B. (Ed.), New York, USA, 1998, pp. 1-36.
- 160) Paina L., Inno al latte e ai suoi derivati, *Il Latte* **6** (1996) 46-49.
- 161) Palmquist D.L., Beaulieu A. D., Barbano D.M., Feed and animal factors influencing mil fat composition, *J. Dairy Sci.* **76** (1993) 1753-1771.
- 162) Palmquist D.L., Jensen R.G., Fatty acid in milk fat, in: Fatty acids in foods and their health implications, 3rd edition, Ching Kuang Chow (Ed.), USA, 2008, pp. 109-126.
- 163) Parodi P.W., Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents, *J. Nutr.* **127** (1997) 1055-1060.
- 164) Parodi P.W., Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat, *J. Dairy Sci.* **82** (1999) 1339-1349.
- 165) Papiz M.Z., Sawyer L., Eliopoulis E.E., North A.C.T., Findlay J.B.C., Sivaprasadarao R., Jones T.A., Newcomer M.E., Kraulis P.J., The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol binding protein, *Nature* **324** (1987) 383-385.
- 166) Pecorari M., Mariani P., Caseina, attitudine alla coagulazione del latte, resa e qualità del formaggio, *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* **41** (1990) 225-244.
- 167) Perfield J.W., Lock A.L., Pfeiffer A.M., Bauman D.E., Effects of amide-protected and lipid-encapsulated conjugated linoleic acid (CLA) supplements on milk fat synthesis, *J. Dairy Sci.* **87** (2004) 3010-3016.
- 168) Piperova L.S., Moallem U., Teter B.B., Sampugna J., Yurawecz M.P., Changes in milk fat in response to dietary supplementation with calcium salts of *trans*-18:1 or conjugated linoleic fatty acids in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.* **87** (2004) 3836-3844.

- 169) Poveda J.M., Pérez-Coello M.S., Cabezas L., Evolution of the free fatty acid fraction in Manchego cheese during ripening, *Milchwissenschaft* **54** (1999) 685-687.
- 170) Prinzenberg E.M., Hiendleder S., Ikonen T., Erhardt G., Molecular genetic characterization of new bovine κ -casein alleles CSN3-F and CSN3-G and genotyping by PCR-RFLP, *Anim. Gen.* **27** (1996) 347-349.
- 171) Prinzenberg E.M., Krause I., Erhardt G., SCCP analysis of the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A,B,C,E,F,G) and three new DNA polymorphism (H,I,A¹), *Anim. Biotechnol.* **10** (1999) 49-62.
- 172) Qi P. X., Studies of casein micelle structure: the past and the present, *Lait* **87** (2007) 363-383.
- 173) Recio I., Amigo L., López-Fandiño R., assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins, *J. Chromatogr. B* **697** (1997) 231-242.
- 174) Rego O.A., Rosa H.J.D., Portugal P., Cordeiro R., Borba A.E.S., Vouzela C.M., Influence of dairy fish oil on conjugated linoleic acid, omega-3 and other acids in milk fat from grazing dairy cows, *Livest. Prod. Sci.* **95** (2005) 27-33.
- 175) Robitaille G., Ng-Kwai-Hang K.F., Monardes H.G., Association of κ -casein glycosylation with milk production and composition in Holstein, *J. Dairy Sci.* **74** (1991) 3314-3317.
- 176) Robitaille G., Britten M., Morisset J., Petitclerc D., Quantitative analysis of β -lactoglobulin A and B variants in milk of cows β -lactoglobulin AB throughout lactation, *J. Dairy Res.* **69** (2002) 651-654.

- 177) Ruottinen O., Ikonen T., Ojala M., Associations between milk protein genotypes and fertility traits in Finnish Ayrshire heifers and first lactation cows, *Liv. Prod. Sci.* **85** (2004) 27-34.
- 178) Russo V., Mariani P., Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico tecnologico e caseario, *Riv. Zoot. Vet.* **1** (1978) 365-379.
- 179) Russo G.L., Della pietra V., Mercurio C., Palumbo R., Iacomino G., Russo M., Tosto M., Zappia V., Protective effects of butyric acid in colon cancer, *Advances in experimental medicine and biology* **472** (1999) 131-147.
- 180) Salvadori del Prato O., Trattato di tecnologia casearia, *Edagricole (Ed.)*, Bologna, 1998.
- 181) Salvadori del Prato O., Tecnologie del latte, *Edagricole (Ed.)*, Bologna, 2005.
- 182) Salza G., Tabellini R., La rinascita della Reggiana: una razza autoctona da tutelare, *Agricoltura*, maggio, (2005) 18-21.
- 183) Schaar J., Hansson B., Pettersson H.E., Effects of genetic variants of κ -casein and β -lactoglobulin on cheesemaking, *J. Dairy Res.* **52** (1985) 429-437.
- 184) Schmidt M.P., Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk, *Bull. Int. Dairy Fed.* **85** (1975) 133-135.
- 185) Secchiari P., Mele M., Serra A., Paoletti F., Le frazioni lipidiche del latte e della carne dei ruminanti, *Atti Conv. "Giornata di studio su: latte e carne dei ruminanti componente lipidica e salute umana"*, Firenze, 6 marzo 2002, pp. 7-96.

- 186) Senocq D., Mollé D., Pochet S., Léonil J., Dupont D., Levieux D., A new bovine β -casein genetic variant characterized by a Met93 - Leu93 substitution in the sequence A², *Lait* **82** (2002) 171-180.
- 187) Stam W., Communicating benefits to health professionals then came to going, *Agro Food Ind. Hi-Tech* **3** (2003) 14-17.
- 188) Strzalkowska N., Krzyzewski J., Zwierzchowski L., Ryniewicz Z., Effects of κ -casein and β -lactoglobulin loci polymorphism, cows' age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black-and-White cattle, *Animal Science Papers and Reports* **20** (2002) 21-35.
- 189) Sulimova G.E., Sokolova S.S., Semikozova O.P., Nguet L.M., Berberov E.M., Analysis of DNA polymorphisms of clustered genes in cattle: casein genes and genes of the major histocompatibility complex (BOLA), *Tsitol I Genetika* **26** (1992) 18-26.
- 190) Sulimova G.E., Badagueva I.N., Udina I.G., Polymorphism of the κ -casein gene in subfamilies of the Bovidae, *Genetika (Moskva)* **32** (1996) 1576-1582.
- 191) Tailford K.A., Berry C.L., Thomas A.C., Campbell J.H., A casein variant in cow's milk is atherogenic, *Atherosclerosis* **170** (2003) 13-19.
- 192) Thorsdottir I., Hill J., Ramel A., Short communication: Seasonal variation in *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid content in milk fat from Nordic Countries, *J. Dairy Sci.* **87** (2004) 2800-2802.
- 193) Timmen H., Patton S., Milk fat globules: fatty acid composition, size and in vivo regulation of fat liquidity, *Lipids* **23** (1988) 685-689.
- 194) Ulbricht T.L.V., Southgate D.A.T., Coronary heart disease: seven dietary factors, *Lancet* **338** (1991) 985-992.

- 195) Urbiené S., Ciuckinas A., Margelyté J., physical and chemical properties and the biological value of goat's, *Milchwissenschaft* **52** (1997) 427-430.
- 196) Van Eenennaam A., Medrano J.F., Milk protein polymorphisms in california dairy cattle, *J. Dairy Sci.* **74** (1991) 1730-1742.
- 197) Visser S., Slangen C.J., Lagerwerf F.M., Vandongen W.D., Haverkamp J., identification of a new genetic variant of bovine β -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis, *J. Chromat. A.* **711** (1995) 141-150.
- 198) Walsh C.D., Guinee T., Harrington D., Mehra R., Murphy J., Connolly J.F., Fitzgerald R.J., Cheddar cheesemaking and rennet coagulation characteristics of bovine milks containing κ -casein AA or BB genetic variants, *Milchwissenschaft* **50** (1995) 492-496.
- 199) Walsh C.D., Guinee T., Harrington D., Murphy J., Fitzgerald R.J., Ripening characteristics of Cheddar cheese made from bovine milks containing κ -casein AA or BB genetic variants, *Milchwissenschaft* **54** (1999) 323-326.
- 200) Walstra P., On the crystallization habit in fat globule, *Neth. Milk Dairy J.* **21** (1967) 166-191.
- 201) Walstra P., Jenness R., Dairy chemistry and physics, *John Wiley & Sons Inc. (Ed.)*, New York, USA, 1984.
- 202) Whitlock L.A., Schingoethe D.J., AbuGhazaleh A.A., Hippen A.R., Kalscheur K.F., Milk production and composition from cows fed small amounts of fish oil with extruded soybeans, *J. Dairy Sci.* **89** (2006) 3972-3980.
- 203) Winkelman A.M., Wickham B.W., Associations between milk protein genetic variants and production traits in New Zealand dairy cattle, in: Milk Protein

Polymorphism. Proc. Int. Dairy Fed. Sem., Palmerston North, New Zealand, *Int. Dairy Fed. (Ed.)*, Brussels, Belgium, 1997, pp. 38-46.

- 204) Zhang R.H., Mustafa A.F., Zhao X., Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese, *Anim. Feed Sci. Tech.* **127** (2006a) 220-233.
- 205) Zhang R., Mustafa A.F., Zhao X., Effects of flaxseed supplementation to lactating ewes on milk composition, cheese yield, and fatty acid composition of milk and cheese, *Small Ruminant Res.* **63** (2006b) 233-241.

SITI INTERNET CONSULTATI:

www.agraria.org. "Reggiana Atlante delle razze bovine - Razze minori italiane." Oct. 29, 2008. 2008.

www.aiab.it. "La bovina di razza Reggiana.". 2008.

www.arpa.emr.it. "Biodiversità e zootecnia in Emilia-Romagna.". 2008.

www.google.it. "Struttura tridimensionale della β -lattoglobulina".

www.itazanelli.it. 2008.

www.razzareggiana.it. Oct. 29, 2008.